

**Neuronale Plastizität im auditorischen und limbischen System der
Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)
nach experimenteller Tinnitusauslösung:
Immunhistochemischer Nachweis von Arg3.1 und c-Fos**

Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Hochschule Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor rerum naturalium

genehmigte

Disseration von

Claudia Mahlke

aus Berlin

Berichterstatter: Prof. Dr. Langner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Himstedt

Tag der Einreichung: 19. März 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Mai 2004

Darmstadt, im März 2004

Mein Dank gilt allen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Im besonderen möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Langner für die Übernahme des Referats und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und bei Herrn Prof. Dr. Himstedt für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Dr. Elisabeth Wallhäusser-Franke danke ich für die sehr engagierte Betreuung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Weiterhin danke ich allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die gute Stimmung und den Zusammenhalt auch in schwierigen Zeiten. Im Besonderen möchte ich mich bei meinem Zimmergenossen Michael Ochse für die Hilfe bei vielen großen und kleinen Computerproblemen bedanken. Gabriele Wenz danke ich für die Unterstützung im Labor.

Vielen Danke auch an Prof. Dr. Kuhl und seine Arbeitsgruppe, in deren Labor ich die *in situ*-Hybridisierungs-Experimente durchführen konnte. Ein großes Dankeschön an Niels Plath für die Betreuung und das Auflegen des einen oder anderen Films.

Danke auch an alle Mitglieder des Graduiertenkollegs 340 für die spannenden Einblicke in die unterschiedlichsten Forschungsgebiete. Die zwei „*Summerschools*“ in Rietzlern werden mir lebhaft in Erinnerung bleiben.

Ein ganz dickes Dankeschön an Dr. Annette Hurst für das Korrekturlesen der Arbeit und die vielen hilfreichen Kommentare und an Tobias Meckel für die Aufnahmen der Fluoreszenzbilder am Konfokalmikroskop.

Danke an Oliver Gerhartz, dem „Herrn Doktor“, der mich in zu vielen Dingen unterstützt hat, als das ich sie hier einzeln aufzählen könnte.

Meinen Eltern möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken und auch dafür, dass sie immer hinter meinen Entscheidungen standen, auch wenn diese manchmal etwas abwegig erschienen. Dank auch an meine Nichte Marina Himmel, die mich immer daran erinnert, dass es im Leben wichtigere Dinge gibt als Doktorarbeiten zu schreiben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Zoologie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. G. Langner in der Zeit von Februar 2001 bis März 2004 angefertigt. Die Arbeit wurde durch ein Stipendium des Forschungsreferats der TU Darmstadt, durch das Graduiertenkolleg 340 „Kommunikation in biologischen Systemen“ der deutschen Forschungsgemeinschaft und durch den *Adolf-Messer-Preis* 1999 an Dr. Wallhäusser-Franke gefördert.

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Wallhäusser-Franke, E., Mahlke, C., Oliva, R., Braun, S., Wenz, G., & Langner, G., 2003, "Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus", *Exp.Brain Res.*, 153, 649-654.

Mahlke, C., Wallhäusser-Franke, 2004, „Evidence for Tinnitus-Related Plasticity in The Auditory and Limbic System, Demonstrated by Arg3.1 and C-fos Immunocytochemistry”, *Hearing Research*, accepted

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das zentrale auditorische System	1
1.1.1	Auditorischer Cortex	4
1.1.2	Corpus geniculatum mediale	6
1.1.3	Colliculus inferior	6
1.1.4	Nucleus cochlearis	7
1.2	Das limbische System	8
1.3	Tinnitus aurium	11
1.3.1	Definition	11
1.3.2	Tinnitus im Tiermodell	12
1.3.3	Modelle zur Entstehung von Tinnitus	14
1.4	Marker-Proteine für die Untersuchung neuronaler Plastizität	19
1.5	Fragestellung	25
2	MATERIAL UND METHODEN	26
2.1	Versuchstiere	26
2.2	Versuchsreihe 1: Immunhistochemischer Nachweis des Arg3.1- und c-Fos-Proteins nach akustischer Stimulation, Salicylat- und Salineinjektion	30
2.2.1	Behandlung der Versuchstiere	30
2.2.2	Perfusion	31
2.2.3	Immunhistochemie	32
2.2.4	Auswertung	34
2.2.4.1	Bestimmung der ausgewerteten Gebiete	35
2.2.4.2	Quantitative und qualitative Auswertung	38
2.2.4.3	Mann-Whitney U-Test	39
2.3	Versuchsreihe 2: Einfluss des Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin auf die Arg3.1- und c-Fos-Produktion nach Salicylatinjektion	40
2.4	Versuchsreihe 3: Nachweis der <i>arg3.1</i>-mRNA nach Salicylat-injektion durch eine radioaktive <i>in situ</i>-Hybridisierung	41
2.4.1	Behandlung der Versuchstiere	41
2.4.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung	41
2.4.3	Nissl-Färbung	46
2.4.4	Auswertung	47

2.5	Versuchsreihe 4: Charakterisierung der Arg3.1-bildenden Neurone über Fluoreszenz-Doppelmarkierungen	47
2.5.1	Behandlung der Versuchstiere	47
2.5.2	Fluoreszenz-Doppelfärbung	47
2.5.3	Auswertung	50
3	ERGEBNISSE	51
3.1	Ergebnisse aus Versuchsreihe 1: Immunhistochemischer Nachweis des Arg3.1- und c-Fos-Proteins nach akustischer Stimulation, Salicylat- und Salineinjektion	51
	Fehler! Textmarke nicht definiert.	
3.1.1	Allgemeine Beobachtungen	51
3.1.2	Lokalisation des Arg3.1-Proteins im auditorischen System	52
3.1.3	Lokalisation des c-Fos-Proteins im auditorischen System	59
3.1.4	Lokalisation des Arg3.1-Proteins im limbischen System	63
3.1.5	Lokalisation des c-Fos-Proteins im limbischen System	65
3.1.6	Quantitative Analyse	66
3.2	Ergebnisse aus Versuchsreihe 2: Einfluss des Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin auf die Arg3.1- und c-Fos-Produktion nach Salicylatinjektion	72
3.3	Ergebnisse aus Versuchsreihe 3: Lokalisation der <i>arg3.1</i>-mRNA nach Salicylatinjektion durch <i>in situ</i>-Hybridisierung	76
3.3.1	Allgemeine Beobachtungen	76
3.3.2	Lokalisation der <i>arg3.1</i> -mRNA im auditorischen Cortex	76
3.3.3	Lokalisation der <i>arg3.1</i> -mRNA in der Amygdala	79
3.4	Ergebnisse aus Versuchsreihe 4: Charakterisierung der Arg3.1-Neurone über Fluoreszenz-Doppelfärbungen	79
3.4.1	Allgemeine Beobachtungen	79
3.4.2	Arg3.1/Nissl-Fluoreszenz-Doppelfärbung	79
3.4.3	Arg3.1/GABA-Fluoreszenz-Doppelfärbung	81
3.4.4	Arg3.1/c-Fos-Fluoreszenz-Doppelfärbung	81
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	84
4	DISKUSSION	85
4.1	Methodendiskussion	85
4.1.1	Wirkung des Salicylats	85
4.1.2	Immunhistochemischer Nachweis der neuronalen Plastizitätsmarker Arg3.1 und c-Fos	87
4.1.3	Lokalisation der <i>arg3.1</i> -mRNA über <i>in situ</i> -Hybridisierung	89
4.1.4	Charakterisierung der Arg3.1-Neurone über Fluoreszenz-Doppelfärbungen	91

4.2	Arg3.1 und c-Fos im auditorischen System	92
4.2.1	Arg3.1 und c-Fos im auditorischen Cortex	92
4.2.1.1	Arg3.1 und c-Fos nach akustischer Stimulation	92
4.2.1.2	Arg3.1 und c-Fos nach Salicylatinjektion	94
4.2.1.3	Arg3.1 und c-Fos nach Salineinjektion	96
4.2.2	Arg3.1 und c-Fos in subcorticalen auditorischen Gebieten	97
4.2.2.1	Arg3.1 und c-Fos im Colliculus inferior	97
4.2.2.2	Arg3.1 und c-Fos im Nucleus Cochlearis	99
4.3	Arg3.1 und c-Fos im limbischen System	100
4.4	Salicylatbedingte Aktivierung des thalamocorticalen Systems	103
4.5	Plastische Veränderungen im auditorischen Cortex nach Salicylatinjektion und akustischer Stimulation	105
4.6	Modulation der plastischen Veränderungen im auditorischen Cortex nach Salicylatinjektion	107
4.7	Neuronale Plastizität und das Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus	110
4.8	Ausblick	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
	ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133

1 Einleitung

Tinnitus aurium ist eine Hörempfindung, die nicht von einem akustischen Signal herrührt, sondern innerhalb des Hörsystems entsteht und vom Betroffenen als reales, oft störendes Geräusch empfunden wird. Trotz mangelnder Untersuchungsergebnisse wird als Ursache häufig eine pathologische Aktivierung von Haarsinneszellen im Innenohr angenommen. Am Tiermodell erhobene Befunde legen jedoch nahe, dass nicht die Aktivierung, sondern die Unterdrückung der Haarzellaktivität der Auslöser für Tinnitus ist. Die dem Tinnitus entsprechende neuronale Aktivität entsteht erst im zentralen Hörsystem und könnte prinzipiell in jedem Kerngebiet der Hörbahn generiert werden. Da ein Tinnitus ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr reversibel ist, nimmt man an, dass anhaltende molekulare Veränderungen in den Neuronen des zentralen Nervensystems zu einer Stabilisierung der Tinnitusaktivität führen. Die Aufklärung dieser molekularen Mechanismen bildet die Grundlage für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in der Tinnitustherapie. Anhaltende, plastische Veränderungen von Nervenzellen gehen mit der Bildung bestimmter plastizitätsrelevanter Proteine einher. In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich daher die Bildung solcher Proteine nach experimenteller Tinnitusauslösung im zentralen Nervensystem von Mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*). Dabei konzentrierte ich mich auf Strukturen des auditorischen und limbischen Systems, da in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass vor allem diese Strukturen an der Entstehung von Tinnitus beteiligt sind.

1.1 Das zentrale auditorische System

Das zentrale auditorische System besteht aus zahlreichen Kerngebieten, die meist bilateral symmetrisch angeordnet sind. In Abbildung 1.1 sind die Verbindungen der verschiedenen Kerngebiete schematisch dargestellt. Vom Innenohr gelangen die Informationen über die primären Hörnervenfasern in den im Hirnstamm gelegenen Nucleus cochlearis (CN). Neben dem CN gehören zu den auditorischen Hirnstammkernen auch die Olivenkerne (Oliva superior; SO) und der Nucleus lemniscus lateralis (NLL). Der CN untergliedert sich in den dorsalen (DCN), den vorderen (anterior) ventralen (AVCN) und den hinteren

(posterior) ventralen CN (PVCN). Der CN ist über verschiedene Bahnen mit dem contralateralen Colliculus inferior (IC) verbunden. Direkte Projektionen ziehen aus dem DCN und PVCN in den contralateralen IC. Andere Projektionen führen aus dem DCN und dem PVCN in den contralateralen NLL und von dort in den IC. Aus dem AVCN gibt es Verbindungen in die SO und von dort in den NLL und den IC. Aus dem IC, der im Mittelhirn liegt, wird die Information an das Corpus geniculatum mediale (MGB, medialer Kniekörper) im Thalamus weitergegeben. Die letzte Station der zentralen auditorischen Hörbahn bildet der auditorische Cortex (AC). Ein allgemeines Organisationsprinzip der auditorischen Kerngebiete ist die Organotopie, d.h. das periphere Sinnesepithel ist in den Kernregionen topographisch abgebildet. Für die auditorischen Gebiete bedeutet dies, dass die Basilarmembran der Cochlea in ihrer Länge repräsentiert ist (Cochleotopie) und da es sich um eine Frequenzanalyse handelt, werden bestimmte Frequenzen an bestimmten Orten repräsentiert (Tonotopie). Jedes Kerngebiet der zentralen Hörbahn besteht aus mehreren Unterkernen, wobei mindestens einer dieser Kerne tonotop organisiert ist. Die Hörbahn, die die tonotopen Unterkerne miteinander verbindet, wird häufig auch als lemniscale oder tonotope Hörbahn bezeichnet. Nicht tonotop organisierte Unterkerne sind oft polysensorisch und bekommen neben den auditorischen auch andere z.B. somatosensorische Eingänge. Man bezeichnet die Verbindungen zwischen diesen Gebieten häufig auch als extralemniscale oder polysensorische Hörbahn (Ehret und Romand, 1997). Im Hörsystem existieren neben der aufsteigenden zentralen Hörbahn eine Reihe von Rückprojektionen (Efferenzen). Über diese Rückprojektionen, sowohl zu den tonotop organisierten, als auch zu den polysensorischen Kernen, werden auditorische Hirnregionen meist reziprok miteinander verbunden. Man nimmt an, dass der sensorische Eingang in das auditorische System schon auf frühen Verarbeitungsstufen über solche Rückkopplungsschleifen reguliert wird. So gibt es z.B. Rückkopplungsschleifen zwischen den Olivenkernen und dem CN, zwischen IC und CN, zwischen IC und den Olivenkernen und zwischen IC und NLL (Ehret und Romand, 1997). Der IC interagiert mit dem thalamocorticalen System, welches selbst eine Rückkopplungsschleife zwischen Thalamus und Cortex darstellt. Zudem sind Rückprojektionen aus dem AC in den externen und dorsalen Cortex des IC und direkt in den DCN beschrieben worden (Budinger et al., 2000b; Weedmann und Ryugo, 1996). Im Folgenden werden die auditorischen Kerngebiete näher beschrieben, die für die Entstehung von Tinnitus eine entscheidende Rolle spielen.

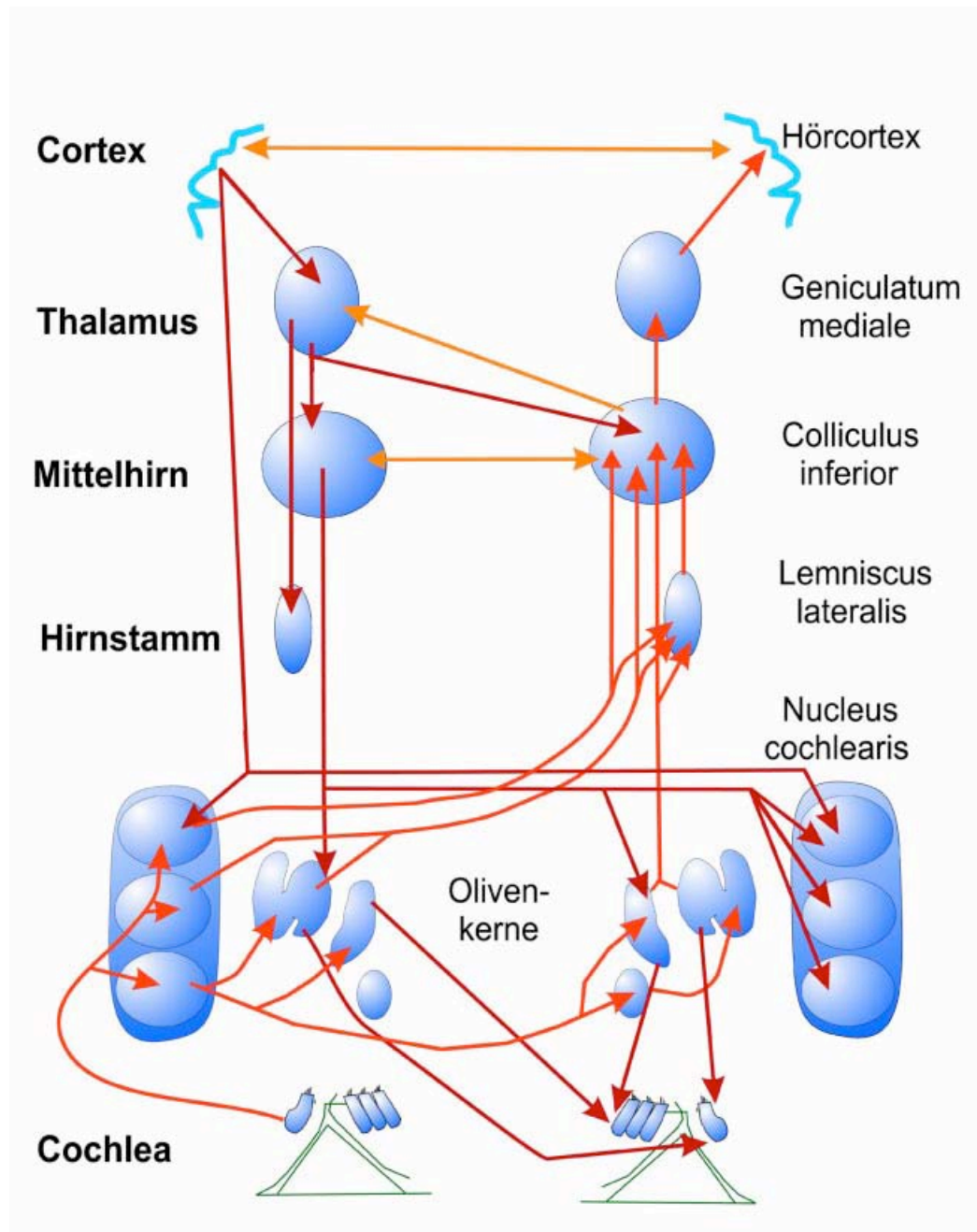


Abb.1.1 Vereinfachte Darstellung des zentralen Hörsystems

Das Hörsystem ist bilateral symmetrisch angelegt. Die eingehende Schallinformation wird im Innenohr, der Cochlea, in Nervenimpulse umgesetzt und über mehrere serielle und parallele Verarbeitungsstufen aufwärts (afferent, orange) zum Cortex geleitet. Die absteigenden, efferenten Verbindungen (rotbraun) sind für die Regelung der Empfindlichkeit in einzelnen Kerngebieten des Hörsystems und auch in der Cochlea wichtig. Wie im Schema für den NC gezeigt, lassen sich alle Gebiete der Hörbahn in Untergebiete unterteilen (Wallhäusser-Franke und Langner, 2001).

1.1.1 Auditorischer Cortex

Der auditorische Cortex (AC) ist der Teil des Neocortex, der an der primären Verarbeitung auditorischer Stimuli beteiligt ist. Für alle bisher untersuchten Tiere wurden mehrere corticale Repräsentationen der Cochlea und damit mehrere tonotop organisierte auditorische Felder gefunden. Darüber hinaus wurden auch nicht tonotop organisierte auditorische Felder beschrieben. Neben der Tonotopie zeigt der primäre AC auch eine geordnete räumliche Anordnung der Neurone, die auf bestimmte zeitlich Muster antworten. Man spricht hier von Periodotopie. Die Periodotopie ist laut Langner et al. (1997) orthogonal zur Tonotopie angeordnet.

Die funktionelle Spezifizierung der einzelnen Felder kann über die Eingänge bestimmt werden, die von den thalamischen Kernen des Corpus geniculatum mediale (MGB) und anderen thalamischen und extrathalamischen Kernen kommen. Zum Beispiel werden Felder, die Eingänge aus dem ventralen, tonotopen Teil des MGB (vMGB) bekommen, zu den primär sensorischen Feldern gezählt (Ehret und Romand, 1997). Die Einteilung kann aber auch aufgrund funktioneller Kriterien erfolgen. Für die Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) wurden elektrophysiologisch (Thomas et al., 1993) und mit Hilfe der 2-Deoxyglucose-Methode (2-DG; Scheich et al., 1993) mehrere funktionelle auditorische Felder bestimmt, die sich durch das Antwortverhalten ihrer Neurone und ihre Tonotopie unterscheiden.

Das größte der Felder im AC ist das primäre Feld AI, mit einer Fläche von 2 mm^2 , in dem Neurone auf akustische Stimulation mit eng abgestimmten starken ON-Antworten und kurzen Latenzen antworten. Hohe Frequenzen sind rostral, tiefe caudal repräsentiert. Der Frequenzbereich von 0,1- 10 kHz belegt etwa 75% der Fläche von AI. Dies entspricht auch dem sensitivsten Hörbereich der Wüstenrennmaus (Ryan, 1976). Rostral zu AI liegt das anteriore auditorische Feld AAF, welches ebenfalls als primäres Feld angesehen wird und eine zu AI spiegelbildliche Tonotopie besitzt. AI und AAF besitzen dementsprechend eine gemeinsame hochfrequente Grenze (siehe auch Abb. 1.2). Caudal zu AI liegt das posteriore Feld P, welches sich in einen dorsalen (DP) und einen ventralen Teil (VP) untergliedert. DP weist eine konzentrische Tonotopie auf, mit hohen Frequenzen in der Mitte. VP ist wiederum spiegelbildlich zu AI organisiert und hat daher eine gemeinsame tieffrequente Grenze mit AI. Außer diesen vier tonotop organisierten Feldern gibt es noch drei weitere nicht tonotope Felder D, V und AV.

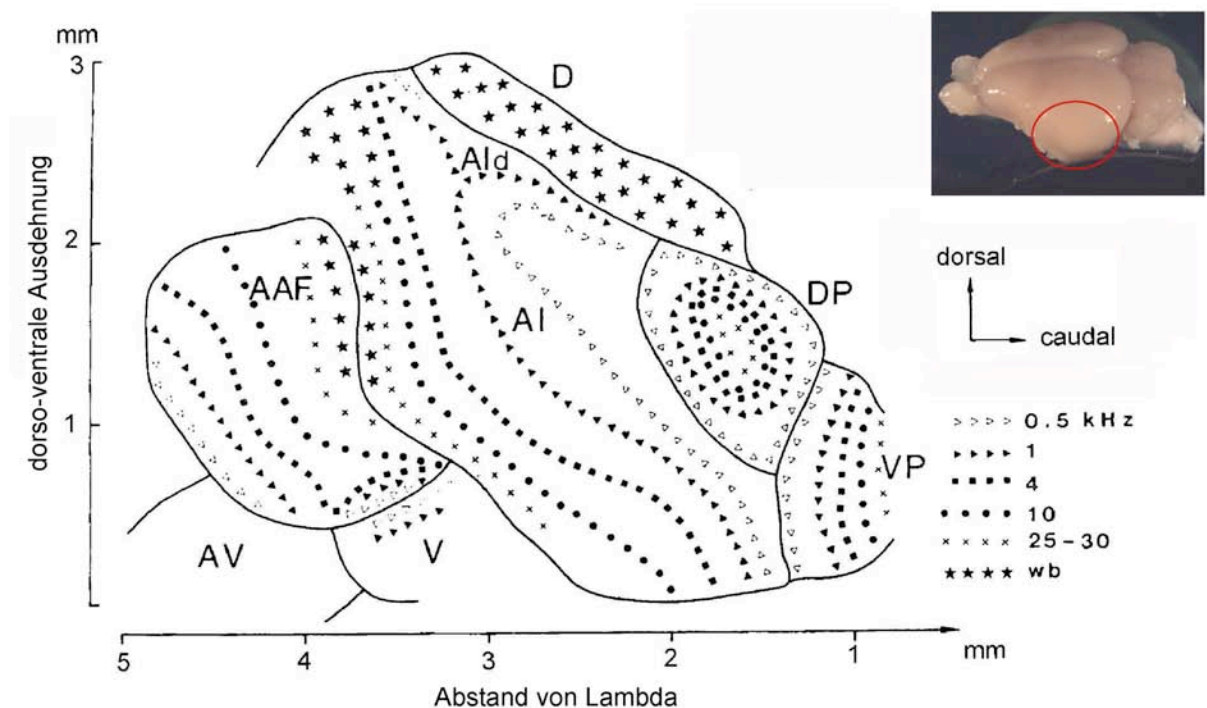


Abb.1.2 Elektrophysiologische Karte des auditorischen Cortex (AC) der Wüstenrennmaus

In der Fotografie rechts oben ist die Lage des AC durch die eingezeichnete Ellipse angedeutet. In der Mitte liegt Feld AI mit hohen Frequenzen rostral und tiefen Frequenzen caudal. Rostral von AI liegt das Feld AAF. AAF weist eine zu AI spiegelbildliche Tonotopie auf. An der Grenze zwischen AI und AAF finden sich Neurone, die breit abgestimmt sind (Sterne), d.h. auf viele Frequenzen gleich gut antworten. DP und VP liegen caudal zu AI und haben eine gemeinsame tieffrequente Grenze mit AI. Dorsal zu AI und DP liegt das Feld D, dessen Neurone generell eine breite „Abstimmung“ aufweisen. Ventral zu AI und AAF liegen die Felder AV und V über deren Organisation nicht sehr viel bekannt ist (Thomas et al., 1993)

Der auditorische Cortex wird, wie die meisten anderen corticalen Gebiete, über die Größe und Dichte der Neurone in sechs Schichten unterteilt. Diese Schichten werden von der Cortexoberfläche nach medial als Schicht I-VI bezeichnet. Die aufsteigenden Afferenzen aus dem Thalamus terminieren in den Schichten IV und III. In Schicht I enden Projektionen aus dem medialen, nicht tonotopen Teil des MGB (mMGB). Die inneren Schichten V und VI formen die absteigenden, oder auch corticofugalen Projektionen in den IC und den MGB. Cortico-corticale Verbindungen entspringen den Schichten III und V, während die Schichten II und III massive intrinsische Verknüpfungen ausweisen (Ehret und Romand, 1997).

Wenn man im rechten Winkel zur Cortexoberfläche entlang der corticalen Schichten das Antwortverhalten der Neurone im AC elektrophysiologisch untersucht, zeigt sich, dass alle Neurone die gleichen Bestfrequenzen aufweisen (Sugimoto et al., 1997). Diese

„Kolumnen“ gleicher Bestfrequenzen werden auch als Isofrequenz-Banden bezeichnet. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Horizontalschnitte verwendet, da in dieser Schnittrichtung die Tonotopie am besten zu erkennen ist (siehe auch Abb. 2.3).

Eine deutlich erhöhte synaptische Aktivität wurde nach experimenteller Tinnitusauslösung im Vergleich zu Kontrolltieren in den primären Feldern AI und AAF des AC beobachtet (Wallhäusser-Franke et al., 1996 und 2003). Man nimmt an, dass eine corticale Aktivierung mit der Wahrnehmung von Geräuschen einhergeht. Dementsprechend führt die experimentelle Tinnitusauslösung zu einer Wahrnehmung von Geräuschen, selbst wenn keine externe Schallquelle vorhanden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die durch Aktivierung ausgelöste Bildung plastizitätsrelevanter Proteine in AI und AAF untersucht.

1.1.2 Corpus geniculatum mediale

Der mediale Kniekörper (MBG) wurde in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht. Dennoch ist die Aktivierung des thalamocorticalen Systems ein entscheidender Bestandteil des Modells zur zentralen Entstehung von Tinnitus (1.3.3.) und soll daher näher erläutert werden. Der MGB kann aufgrund seiner Zytoarchitektur in drei Untereinheiten aufgeteilt werden, den ventralen (vMGB), den medialen (mMGB) und den dorsalen MGB (dMGB). Der vMGB erhält Projektionen aus dem tonotopen Bereich des IC, dem ICC und sendet Afferenzen in die primären auditorischen Felder AI und AAF des AC. Er ist tonotop organisiert und bildet die Hauptumschaltstelle zwischen dem auditorischen Mittelhirn und dem Cortex. Der dMGB ist nicht tonotop organisiert und erhält Eingang aus den nicht tonotopen Gebieten des IC. Der mMGB bekommt neben den auditorischen Eingängen aus dem ICC und dem ECIC auch somatosensorische, visuelle und vestibuläre Eingänge, er ist somit ein polysensorischer Kern (Ehret und Romand, 1997).

1.1.3 Colliculus inferior

Der Colliculus inferior (IC) ist das wichtigste auditorische Gebiet des Mittelhirns. Er gilt als die Hauptumschaltstelle zwischen dem auditorischen Hirnstamm und dem Thalamus. Die Einteilung der Unterkerne des IC ist nicht ganz einheitlich. Laut Budinger et al.

(2000b) besteht der IC der Wüstenrennmaus aus einem zentralen Bereich (ICC), einem dorsalen Teil (dorsaler Cortex des IC; DCIC) und einem lateral gelegenen Bereich, der als externer Cortex (ECIC) bezeichnet wird. Der dorsale Cortex wird häufig auch als perizentraler IC (ICP) bezeichnet (Ehret und Romand, 1997). In der vorliegenden Arbeit verwende ich die Einteilung nach Budinger (2000b). Zudem besteht eine Diskrepanz zwischen anatomischen und elektrophysiologischen Daten. Während elektrophysiologische Untersuchungen auf einen großen ICC und kleinere externe Gebieten hindeuten (Herbert et al., 1991), zeigen anatomische Untersuchungen größere externe Strukturen und einen kleineren ICC (Budinger et al., 2000b). Der ICC ist tonotop organisiert und erhält hauptsächlich Eingangsinformationen aus den auditorischen Hirnstammkernen. Von dort wird die Information an die nicht tonotop organisierten Bereiche ECIC und DCIC weitergegeben, die zusätzlich über corticofugale Rückprojektionen aus dem Thalamus und Cortex und durch somatosensorische Eingänge innerviert werden. Die Isofrequenz-Banden im ICC verlaufen von dorso-medial nach ventro-lateral, dabei sind tiefe Frequenzen weiter dorsal und hohe Frequenzen weiter ventral lokalisiert (Friauf, 1992; Ehret und Romand, 1997; Schreiner und Langner, 1997). Dementsprechend ist die Tonotopie im ICC am besten in Transversalschnitten zu sehen. Neben der Frequenzanalyse findet im IC auch eine Analyse zeitlicher Strukturen eines Schallreizes statt, die so genannte Periodizitätsanalyse (Langner, 1992).

Für den IC wurden nach experimenteller Tinnitusauslösung unterschiedliche Ergebnisse gefunden. Während in unserer Arbeitsgruppe in diesen Gebieten nach experimenteller Tinnitusauslösung eine reduzierte Aktivität beobachtet wurde (Wallhäusser-Franke et al., 1996 und 2003), zeigten andere Autoren im IC eine erhöhte Spontanaktivität und c-Fos-Bildung (Chen und Jastreboff, 1996; Manabe et al., 1997; Wu et al., 2003, Zhang et al., 2003). Die Diskrepanzen können jedoch über die unterschiedlichen Zeitpunkte und Gebiete erklärt werden, die für die Untersuchung gewählt wurden (siehe 4.2.2.1).

1.1.4 Nucleus cochlearis

Der Nucleus cochlearis (CN) ist Teil des Hirnstamms und wird dorsal vom Cerebellum überdacht. Er wird aufgrund seiner heterogenen Zellstruktur in drei Unterkerne gegliedert, den dorsalen CN (DCN), den posterior ventralen CN (PVCN) und den anterior ventralen CN (AVCN). Der Hörnerv tritt an der Grenze zwischen AVCN und PVCN in den CN ein.

Die Axone des Hörnervs teilen sich auf. Ein Teil innerviert den AVCN, der andere zieht in den PVCN und verzweigt sich dort in zwei Kollaterale, die den PVCN und den DCN innervieren. Für alle Gebiete des CN wurde eine tonotopische Anordnung der Frequenzen mit einem Gradienten von hohen zu tiefen Frequenzen in dorso-ventraler Ausdehnung beschrieben, welche am besten in Transversalschnitten zu sehen ist (Friauf, 1992; Saint-Marie et al., 1999). Während im VCN nach experimenteller Tinnitusauslösung generell kein Unterschied zu Kontrollbehandlungen gefunden wird (Wallhäusser-Franke et al., 1997; 2003), kommt es im DCN nach einem Schalltrauma zu einer erhöhten Spontanaktivität (Zhang und Kaltenbach, 1998; Kaltenbach und Afman, 2000; Brozoski et al., 2002) und zu einer erhöhten Bildung des neuronalen Markerproteins c-Fos (Mahlke, 1999).

1.2 Das limbische System

James Papez behauptete 1937, dass das corticale Substrat für Gefühle ein Ring phylogenetisch primitiver Rinde um den Hirnstamm sei, eine Region die Paul Broca den limbischen Lobus (lateinisch *limbus* für „Saum“) nannte. Das limbische System umfasst den Gyrus parahippocampalis, der die vordere und untere Fortsetzung des Gyrus cinguli darstellt sowie die darunter liegende Rinde der Hippocampusformation. Zur Hippocampusformation gehören der eigentliche Hippocampus, der Gyrus dentatus und das Subiculum (Kandel et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Regionen des limbischen Systems näher untersucht, die Amygdala und der Gyrus cinguli.

Die Amygdala (Mandelkern) ist der im Zusammenhang mit Emotionen wichtigste Teil des limbischen Systems. Sie liegt im rostro-medialen Teil des Temporallappens und besteht aus mindestens zehn Kernen, die miteinander über topographisch organisierte Wege verbunden sind (Pitkänen und Amaral, 1998). Cytoarchitektonisch und funktionell kann man sie in drei Hauptkerne unterteilen, die laterale, die mediale und die zentrale Amygdala. Die Amygdala unterhält massive Verbindungen zum Neocortex. Sie erhält Eingang aus dem auditorischen, dem visuellen, dem olfaktorischen und dem somatosensorischen System. Darüber hinaus steht sie funktionell in enger Beziehung zum Hippocampus (Sah et al., 2003; Amaral, 1986).

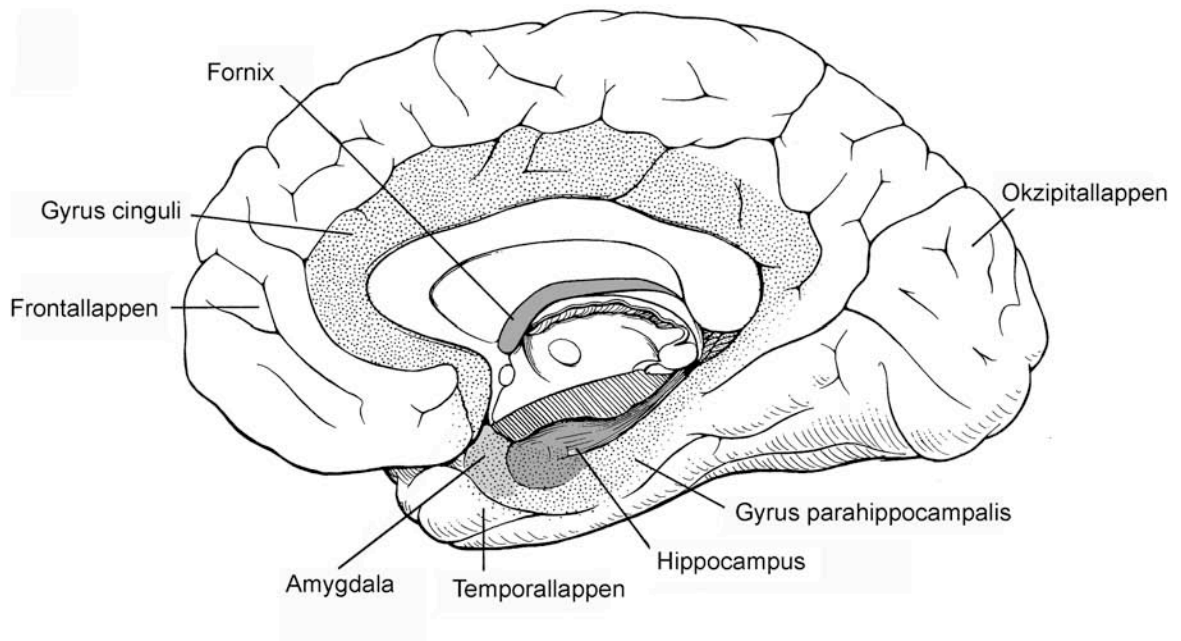


Abb.1.3 Übersicht über das limbische System, nach Kandel et al., 1995

Die Amygdala scheint die Aufgabe der Integration von emotionalem und autonomem Verhalten zu haben. Elektrische Stimulation der Amygdala in wachen Katzen führt zu „Verteidigungsreaktionen“, wie einem Ausfahren der Krallen oder einer Erhöhung der Atmungsrate (Adelmann, 1987). Eine bilaterale Läsion der Amygdala führt zum so genannten Klüver-Bucy-Syndrom, welches sich durch den Verlust der Beurteilungsfähigkeit emotionaler Aspekte sensorischer Stimuli auszeichnet. Zum Beispiel zeigen Katzen mit bilateraler Amygdalaläsion in gefährlichen Situationen kein Angstverhalten (Adelmann, 1987) und Menschen können nicht beurteilen, ob die Stimme einer anderen Person wütend oder ängstlich klingt (Scott et al., 1997). Demnach ist die Amygdala wichtig für die Detektion emotionaler Ereignisse und die Produktion angemessener Antworten auf solche Ereignisse (Pitkänen et al., 1997). Darüber hinaus spielt sie eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Gedächtnisinhalten, wenn diese emotional relevant sind (LeDoux, 1995; McGaugh et al., 1996; LeDoux, 2003). Über ihre Projektionen in das basale Vorderhirn ist sie außerdem an der Regulation des Wachheitsgrades und der Aufmerksamkeit beteiligt (Gallagher und Holland, 1994; Holland und Gallagher, 1999).

Die zweite Struktur des limbischen Systems, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde, ist der Gyrus cinguli (CG), der zum präfrontalen Cortex (PFC) gehört. Die Nomenklatur für den präfrontalen Cortex des Nagers ist nicht ganz einheitlich. Nach

Zilles und Wree (1995) bilden die cingulären Gebiete zusammen mit den orbitalen und den agranulären insulären Gebieten den präfrontalen Cortex. Die cingulären Gebiete (CG 1-3) bilden dabei den medialen präfrontalen Cortex (mPFC). Swanson et al. (1992) identifizierten zwei anteriore cinguläre Gebiete (dorsal und ventral) und ein prälimbisches Gebiet, die den Gebieten CG1-3 entsprechen.

Die anterioren cingulären Gebiete sind ein wichtiger Bestandteil eines Netzwerkes, das an der Regulation der Aufmerksamkeit (Goldman-Rakic, 1988; Mesulam; 1990; Posner und Peterson; 1990; Colby, 1991) und an der Verarbeitung emotional relevanter Stimuli beteiligt ist (Vogt, 1992; Devinsky, 1995). Läsionen in dieser Region führen beim Menschen zu einer Reihe von Symptomen, wie z.B. Apathie, Unaufmerksamkeit; Fehlregulation der autonomen Funktionen und emotionelle Instabilität (Tow und Whitty, 1953; Corkin, 1979). Zudem spielt der PFC eine wichtige Rolle für das so genannte Arbeitsgedächtnis (*working memory*), da er die Fähigkeit besitzt, kurzzeitige Gedächtnisspuren auf der Basis von Informationen aus der Umwelt zu bewahren (Goldman-Rakic 1990, 1995). Darüber hinaus nimmt man an, dass die Kontrolle, die der PFC auf das Verhalten ausübt von lang anhaltenden Gedächtnisspuren abhängt, die in anderen Teilen des Gehirns gespeichert werden. Über die Verbindungen zwischen dem PFC und dem Temporallappen könnten diese Gedächtnisspuren abgerufen werden. Man bezeichnet diesen Vorgang auch als das „Arbeiten mit dem Gedächtnis“ (*working with memory*).

Sowohl im CG als auch in der Amygdala wurde in früheren Untersuchungen nach tinnitusauslösenden Behandlungen eine erhöhte Menge an c-Fos bildenden Neuronen gefunden (Wallhäusser-Franke et al., 2003).

1.3 Tinnitus aurium

1.3.1 Definition

Als Tinnitus aurium (*tinnitus*= klingeln, Geklingel; *auris*= das Ohr), kurz Tinnitus, werden anhaltende Ohrgeräusche bezeichnet, die entweder auf einem oder auf beiden Ohren oder zentral im Kopf wahrgenommen werden können. Meist berichten Betroffene von einem Pfeifen, Rauschen, Summen, Zischen oder Brummen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen einem seltenen objektiven und einem subjektiven Tinnitus. Ein Tinnitus wird als objektiv bezeichnet, wenn echte physikalische Schwingungen vorhanden sind, die vom Beobachter mit technischen Hilfsmitteln registriert werden können. Meist werden sie durch abnorme Strömungen in Blutgefäßen oder durch Muskelkontraktionen verursacht. Subjektive Ohrgeräusche, die Gegenstand der vorliegenden Untersuchung sind, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie vom externen Beobachter nicht wahrgenommen und keine entsprechenden Schallereignisse registriert werden können. Diesen Ohrgeräuschen liegt demnach keine physikalische Schallquelle zu Grunde. Ein Tinnitus gilt als kompensiert, wenn der Betroffene durch die Ohrgeräusche in seinem normalen Alltag nicht beeinträchtigt wird. Bei einem dekompenzierten Tinnitus, kommen zu den Ohrgeräuschen negative Begleiterscheinungen wie Schlafstörungen, Depressionen, Konzentrationsstörungen und Angstzustände hinzu. Den Ohrgeräuschen wird in diesem Fall besonders viel Aufmerksamkeit gewidmet, was sich in den meisten Fällen verstärkend auf die Ohrgeräusche auswirkt. Bis zu einer Dauer von drei Monaten spricht man von einem akuten Tinnitus. Bleiben diese Geräuschwahrnehmungen für mehrere Monate bestehen, ist der Tinnitus meist nicht mehr reversibel. Auch die momentan erfolgreichsten Therapien führen nicht zu einem Verschwinden der Ohrgeräusche, sondern helfen Betroffenen, besser mit ihrem Tinnitus zu leben. Bleibt ein Tinnitus für mehr als ein Jahr bestehen, so spricht man von einem chronischen Tinnitus (Feldmann, 1998). Allein in Deutschland leiden fast drei Millionen Menschen an Tinnitus, darunter ungefähr 800.000 so ausgeprägt, dass sie intensiver ärztlicher Hilfe bedürfen (Zahlen sind der Homepage der deutschen Tinnitus-Liga entnommen; www.tinnitus-liga.de). In mehr als zwei Dritteln der Fälle geht der Tinnitus mit einer Lärmschwerhörigkeit, einem Knalltrauma, einem Hörsturz oder Morbus Meniere einher. Weniger häufig werden degenerative Schwerhörigkeit und Otosklerose als Ursache angeführt. In einigen Fällen ist die Ursache gänzlich unbekannt. Demnach geht der Tinnitus in den meisten Fällen mit einer Hörstörung im Innenohr einher, die zu 60,7 %

den Hochtonbereich betrifft und wird häufig zum erstenmal in oder nach einer Stresssituation bemerkt (Feldmann, 1998).

1.3.2 Tinnitus im Tiermodell

An Tinnituspatienten können mit Hilfe bildgebender Verfahren Aktivitätsmuster verschiedener Hirnareale untersucht werden. Diese Untersuchungen beziehen sich auf einen bereits bestehenden Tinnitus und geben keinen Aufschluss über die Mechanismen der Entstehung. Zur Klärung der physiologischen und molekularen Grundlagen der Tinnituserstehung benötigt man daher ein Tiermodell.

In Verhaltensexperimenten wurde gezeigt, dass hohe Dosen Salicylsäure (im folgenden als Salicylat bezeichnet) oder ein Schalltrauma bei Nagern zur Wahrnehmung von Geräuschen führen kann (Jastreboff et al., 1988; Jastreboff und Brennan, 1994; Bauer et al., 1999; Bauer und Brozoski et al., 2001; Heffner und Harrington, 2002; Guitton et al., 2003; Rüttiger et al., 2003). Salicylat ist der Wirkstoff des Aspirins. Da es die Prostaglandinsynthese blockiert, lassen sich viele damit zusammenhängende Prozesse beeinflussen. Zum Beispiel werden Schmerzen und Entzündungsreaktionen über eine erhöhte Prostaglandinausschüttung stimuliert. Pyrogene, die zu Fieber führen, passieren die Bluthirnschranke und sorgen in verschiedenen Gebieten des Gehirns, z.B. in der Area praeoptica des Hypothalamus für die Freisetzung von Prostaglandinen (Flower et al., 1980). Dass Salicylat Ohrgeräusche auslösen kann, wurde erstmalig nach Anwendung von Aspirin bei rheumatischer Arthritis beobachtet. Dabei führte eine tägliche Dosis von 4-8 g zu einem bilateralen Hörverlust von 10-40 dB SPL, der meist von einem Tinnitus begleitet wurde. Nach dem Absetzen des Salicylats erholte sich das auditorische System innerhalb von 24-72 Stunden (McFadden und Plattsmier, 1983; McFadden et al., 1984). Jastreboff zeigte 1988 erstmalig, dass Salicylat auch bei Ratten zur Wahrnehmung von Geräuschen führt. Er konditionierte Ratten auf Stille, indem er ihnen dauerhaft ein weißes Rauschen vorspielte, welches von kurzen Phasen absoluter Stille unterbrochen wurde. Wann immer die Stille einsetzte, bekamen die Ratten einen leichten Fußchock. Nach wenigen Sitzungen zeigten sie ein antrainiertes Angstverhalten, welches sich in der Unterdrückung der Trinkrate an einem Wasserspender in den Stillephasen ausdrückte. In darauf folgenden Sitzungen, in denen die Stille nicht mehr mit einem Fußchock kombiniert wurde, testete man, wie lange die Tiere brauchten, bis die antrainierte Angst vergessen wurde. Es zeigte

sich, dass Tiere, denen man Salicylat nach der Trainingsphase injizierte, fast augenblicklich kein Angstverhalten mehr zeigten. Man interpretierte diesen Befund damit, dass die Tiere auch in der Stillephase Geräusche wahrnahmen, also einen Tinnitus hörten. Diese ersten Experimente wurden in mehr oder weniger abgewandelter Form in einer Reihe von weiteren Studien wiederholt (z.B. Brennan und Jastreboff, 1991; Jastreboff und Brennan, 1994; Bauer et al., 1999; Guitton et al., 2003; Rüttiger et al., 2003).

Auch ein Schalltrauma kann bei Nagern zur Wahrnehmung von Ohrgeräuschen führen (Bauer und Brozoski et al., 2001; Heffner und Harrington, 2002). Ein Schalltrauma kann durch eine anhaltende akustische Stimulation mit über 90 dB ausgelöst werden. Kurze impulsartige Schallereignisse dagegen erzeugen ein so genanntes Knall- oder Explosionstrauma (Klinke und Silbernagel, 1996). Im Folgenden wird für beide Traumata der Begriff Schalltrauma verwendet. Ein Schalltrauma geht je nach Intensität und Dauer der Beschallung mit einer vorübergehenden (*temporary threshold shift*) oder einer dauerhaften (*permanent threshold shift*) Anhebung der Hörschwelle einher.

Die Gabe von Salicylat und das Auslösen eines Schalltraumas führen zu einer Verminderung des Hörvermögens. Salicylat interagiert mit dem Motorprotein Prestin der äußeren Haarsinneszellen, wodurch ihre Motilität reduziert wird (Zheng et al., 2000; Oliver et al., 2001; Zhang et al., 2001). In Übereinstimmung damit wurde gezeigt, dass es nach Salicylatgabe zu einer Abschwächung der DPOAEs (*distortion product otoacoustic emissions*) kommt (McFadden und Plattsmier, 1984; Long und Tubis, 1988; Guitton et al., 2003). DPOAEs beruhen auf der Fähigkeit der äußeren Haarsinneszellen, aktiv Schwingungen zu erzeugen, die über das Mittelohrsystem in den äußeren Ohrkanal gelangen und dort mit einem Mikrofön gemessen werden können. Man bezeichnet diese Schwingungen als otoakustische Emissionen. Sie können über kurze akustische Stimuli hervorgerufen werden und dienen der Überprüfung des Hörvermögens (Moulin et al., 1994; Oeken et al., 1998). Gleichzeitig zeigten elektrophysiologische Messungen an einzelnen Hörnervenfasern von Wüstenrennmäusen, dass die systemische Gabe von Salicylat zu einer Erhöhung der Schwelle der Summenaktionspotentiale führt (Müller et al., 2003).

Obwohl die Gabe von Salicylat und ein Schalltrauma mit einer Reduktion des Hörvermögens einhergehen, wurde in verschiedenen zentralen Strukturen des auditorischen Systems eine erhöhte Aktivität festgestellt. So wurde berichtet, dass es bei Nagern nach künstlicher Tinnitusinduktion im Tiermodell zu einer erhöhten Spontanaktivität im DCN (Kaltenbach und McCaslin, 1996; Zhang und Kaltenbach, 1998;

Brozoski et al., 2002) und im IC (Chen und Jastreboff, 1995; Manabe et al., 1997) kam. Zudem wurde postuliert, dass die Gabe von Salicylat und ein Schalltrauma bei Katzen zu einer erhöhten Spontanaktivität im AC führte (Eggermont und Kenmochi, 1998; Noreña und Eggermont, 2003). Mit Hilfe der 2-Deoxyglukose-Methode (2-DG) kann man über die Akkumulation radioaktiv markierter Glukose in aktivierten Neuronen die synaptische Aktivität in allen Hirnregionen gleichzeitig überprüfen. Untersucht man mit dieser Methode die Aktivitätsmuster nach Tinnitusauslösung durch Salicylat oder Schalltrauma, so findet man im Vergleich zu kontrollbehandelten Tieren eine Reduktion der Aktivität in den zentralen auditorischen Strukturen bis hin zum IC, während die Aktivität im AC der selben Tiere erhöht ist (Wallhäusser-Franke et al., 1996). Auch die Untersuchung des aktivitätsinduzierten Gens *c-fos* nach beiden tinnitusauslösenden Behandlungen führte zu vergleichbaren Aktivierungsmustern. Zusätzlich wurde bei diesen Experimenten nach Tinnitusinduktion eine erhöhte Menge c-Fos bildender Neurone in Strukturen des limbischen Systems gefunden (Wallhäusser-Franke et al., 2003). Diese Resultate führten zu einem Modell der zentralen Entstehung von Tinnitus, welches in Kapitel 1.3.3 im Detail erklärt wird. Aufgrund der einfacheren Versuchsdurchführung und der verlässlicheren Tinnitusauslösung wurde in der vorliegenden Arbeit Salicylat benutzt, um bei der Wüstenrennmaus Tinnitus auszulösen.

1.3.3 Modelle zur Entstehung von Tinnitus

Ursprünglich nahm man an, dass Tinnitus peripher in der Cochlea entsteht (Tonndorf, 1980; Kemp, 1981; Zenner und Ernst, 1993). Ein peripherer Tinnitus würde zu einer pathologischen Erregung des Hörnervs führen. Tonndorf (1980) schlug als Erklärung vor, dass es bei Tinnitus zur Ablösung der Zilien der inneren Haarsinneszellen von der Tektorialmembran kommt. Dies würde in einer Öffnung der Transduktionskanäle und einer Erregung der inneren Haarsinneszellen resultieren. Weiterhin wurde angenommen, dass in den Randbereichen einer cochleären Schädigung degenerierte äußere Haarsinneszellen neben intakten inneren Haarsinneszellen liegen. Die fehlenden Stereozilien der äußeren Haarsinneszellen könnten so zu einer Absenkung der Tektorialmembran und damit zu einer pathologischen Erregung der inneren Haarzellen führen (Preyer und Bootz, 1993). Kemp (1981) sowie Zenner und Ernst (1993) postulierten, dass eine Übersteuerung der äußeren Haarzellen die Tektorialmembran in

Schwingungen versetzt, wodurch eine pathologische Erregung der inneren Haarzellen ausgelöst werden könnte.

Die vorgestellten Hypothesen können jedoch nicht erklären, warum der Tinnitus in vielen Fällen nach Durchtrennung des Hörnerven persistiert (Wazen et al., 1997, Ryu et al., 1997). Jastreboff (1999) postuliert, dass an der Entstehung von Tinnitus alle auditorischen Verarbeitungsstationen von der Cochlea bis zum Cortex beteiligt seien. Eine Schädigung der Cochlea würde nach seiner Meinung in einer erhöhten Sensitivität der Neurone innerhalb der auditorischen Hörbahn und damit in der Verstärkung auditorischer Signale resultieren. Die vorhandene Spontanaktivität, die normalerweise nicht detektiert werden kann, könnte dann als Tinnitus wahrgenommen werden. Geht diese Wahrnehmung mit einer negativen Verstärkung durch starke Emotionen oder traumatische Erlebnisse einher, so wird das limbische und das autonome Nervensystem aktiviert. Die Aktivierung dieser beiden Systeme soll dann zu einer Verstärkung des Tinnitussignals führen und zudem für die quälenden Empfindungen verantwortlich sein, die mit einem nicht kompensierten Tinnitus einhergehen. Diesen Annahmen liegen jedoch außer dem Befund, dass es nach Salicylatgabe zu einer erhöhten Spontanaktivität im IC kommt (Chen und Jastreboff, 1995) keine Daten zu Grunde. Zudem wird keine Aussage darüber gemacht, wie es zu der erhöhten Sensitivität und der postulierten Verstärkung des Signals kommen könnte.

Nach experimenteller Tinnitusauslösung im Tiermodell, findet man in Untersuchungen mit der 2-DG-Methode eine reduzierte Eingangsaktivität bis hin zum IC (Wallhäusser-Franke et al., 1996; Müller et al., 2003; Wallhäusser-Franke et al., 2003, siehe auch 1.3.2). Die 2-DG-Methode zeigt vornehmlich die präsynaptische Aktivierung an. Man könnte daher annehmen, dass die Tinnitusaktivität entweder innerhalb des IC, oder in höher liegenden auditorischen Strukturen generiert wird. Gerken (1996) postuliert, dass es durch den verminderten Eingang aus der Cochlea zu einem Wegfall der lateralen Inhibition innerhalb des ICs kommt und damit zu einer Erregung am Rand des durch den Hörschaden unterdrückten Frequenzbereichs. Weiterführend wurde von Langner und Wallhäusser-Franke (1999; siehe auch Wallhäusser-Franke und Langner, 2001) ein Modell zur zentralen Tinnituserstehung entwickelt, welches ebenfalls laterale Inhibition und den Einfluss des limbischen Systems berücksichtigt. Darüber hinaus impliziert dieses Modell, dass nicht-lineare Rückkopplungsschleifen innerhalb des thalamocorticalen Systems zu einer Verstärkung des Signals und der, in Tierexperimenten beobachteten, corticalen Aktivierung führen. Diese Rückkopplungsschleifen stehen unter dem Einfluss aufmerksamkeits- und emotionssteuernder Hirnregionen, wie dem limbischen System und

dem Locus coeruleus. Ein Übermaß an Aufmerksamkeit oder Emotion (z.B. bei Stress) würde damit zu einer Verstärkung des Signals und zur Stabilisierung der Tinnitusaktivität führen (siehe auch Abb. 1.4).

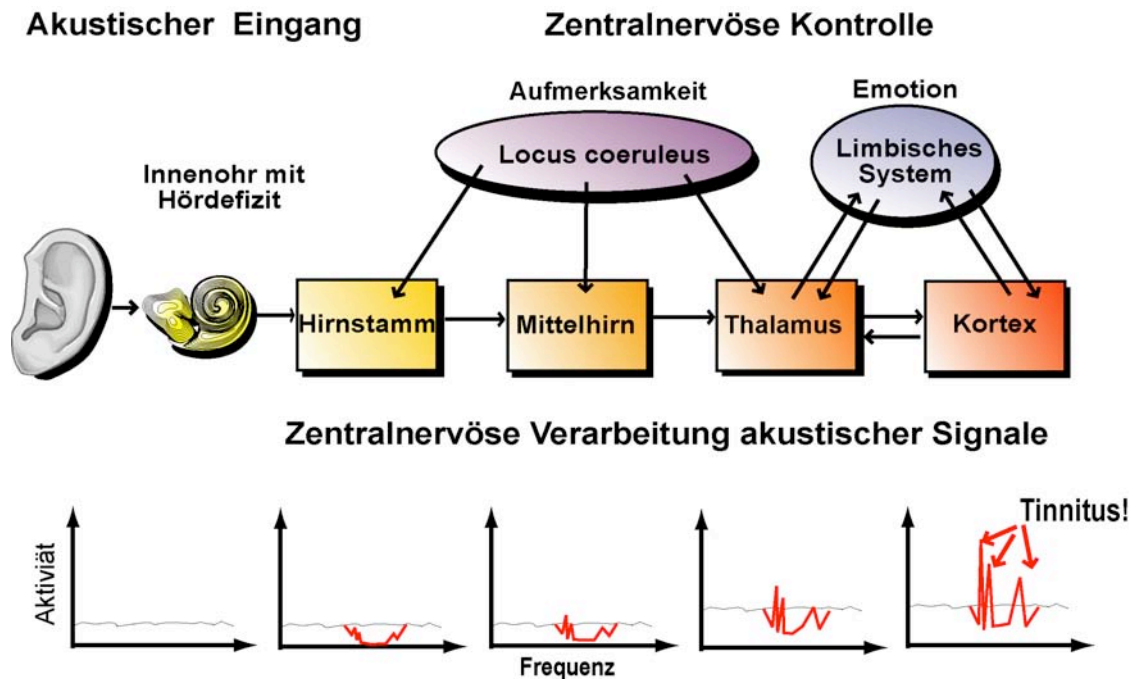


Abb.1.4 Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus

Oben sind die an der Tinnitusentstehung beteiligten Hirnstrukturen schematisch dargestellt. Die Graphen unten zeigen die hypothetische Aktivierung einzelner Frequenzen in den verschiedenen Verarbeitungsstationen. Nach dem Modell stehen die im Hörsystem (Mitte, gelb-rot) bis zum Cortex aufsteigenden neuronalen Signale unter der Kontrolle aufmerksamkeits- und emotionssteuernder Hirngebiete (oben; limbisches System, Locus coeruleus). Nach der Modellannahme versucht das zentrale auditorische System, eine Hörstörung im Innenohr über nichtlineare Rückkopplungsschleifen auszugleichen. Bei einem Übermaß an Emotion und Aufmerksamkeit (z.B. bei Stress) kann es zu einer Überkompensation in den weniger stark geschädigten Randfrequenzen des Hörschadens kommen, die in einer corticalen Aktivierung und der Wahrnehmung eines Tinnitus resultiert (Langner und Wallhäusser-Franke, 1999; Wallhäusser-Franke und Langner, 2001).

Die Stichhaltigkeit dieses Modells wurde anhand einer Computersimulation überprüft (Abb.1.5). Für die Simulation wurden vier Verarbeitungsschichten des Hörsystems mit jeweils 100 „Neuronen“ implementiert. Die Eingangsschicht bestand aus einer einlagigen, tonotop angeordneten Schicht, die eine einfache Repräsentation des Hörnerven darstellte. Es wurde berücksichtigt, dass die Haarzellen des Innenohrs auch bei Stille spontan aktiv sind. Diese Spontanaktivität war im Bereich des „eingebauten“ Hörschadens teilweise unterdrückt. Drei sich anschließende Schichten stellten Kerngebiete des Hörsystems dar. Die Funktion der zweiten Ebene, die dem IC entspricht, beschränkt sich auf eine Verschärfung der Frequenzabstimmung durch laterale Inhibition. Zwischen der corticalen vierten Ebene und der dritten Ebene wurde eine nichtlineare positive Rückkopplung eingebaut, deren Stärke variiert werden konnte. Nach dem Modell wird die Stärke dieser Rückkopplung durch das limbische System und den Locus coeruleus kontrolliert. In der Simulation führt der Wegfall lateraler Inhibition auf den unteren Ebenen nur zu einer leichten Aktivitätsanhebung an den Kanten des Hörschadens, während die corticale Rückkopplung die Flanken und Spitzen im Bereich des Hörschadens deutlich verstärkt. Das Modell impliziert, dass plastische Veränderungen innerhalb der Rückkopplungsschleifen zu einer Etablierung der Tinnitusaktivität führen können, die dann unabhängig von auditorischen Eingängen oder peripherer Spontanaktivität bestehen bleiben kann. In der vorliegenden Arbeit interessierte ich mich daher für die Frage, ob neuronale Plastizität bei der Entstehung von Tinnitus eine Rolle spielt, und welche Strukturen des zentralen Nervensystems davon betroffen sind. Da das gesamte zentrale Nervensystem simultan betrachtet werden sollte, untersuchte ich die Bildung bestimmter Marker-Proteine für plastische Veränderungen.

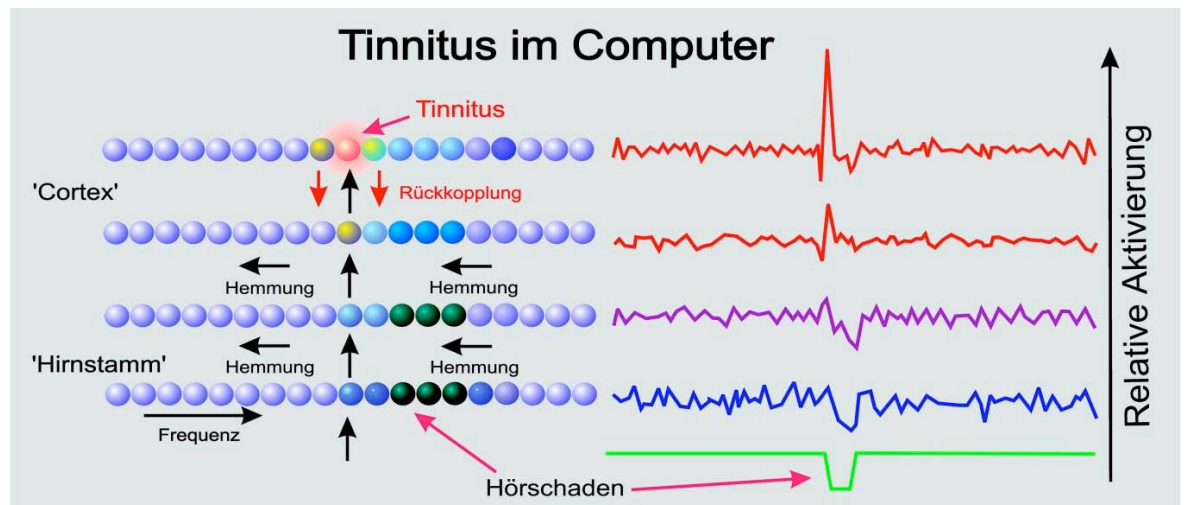


Abb.1.5 Computersimulation zur zentralen Entstehung von Tinnitus

Die Abbildung zeigt die der Computersimulation zugrunde liegende Idee. Ein peripherer Hörschaden wird als Aktivitätsreduktion in das zentrale Hörsystem übertragen. Die Kurven auf der rechten Seite stellen die relativen Aktivierungen auf den einzelnen Ebenen des Modells dar. Die unterste (grüne) Kurve zeigt den auf wenige Frequenzen begrenzten Höreinbruch, an dessen tieffrequenter Flanke im Hörcortex der Tinnitus entsteht. Die weiteren Kurven entstehen durch die aufgrund des Hörschadens veränderte Übertragung entlang einer hypothetischen Frequenzachse unter dem Einfluss von lateraler Inhibition und nicht-linearer Rückkopplung. In der obersten, roten Kurve ist deutlich ein Maximum, entsprechend einem Tinnitus mit tonalem Charakter zu erkennen (Wallhäusser-Franke und Langner, 2001).

1.4 Marker-Proteine für die Untersuchung neuronaler Plastizität

Plastische Veränderungen von Nervenzellen können kurzfristig und vorübergehend oder lang anhaltend die Effizienz der synaptischen Übertragung verändern. Kurzfristige Änderungen können über eine Veränderung in der Transmitterausschüttung oder die Phosphorylierung von Rezeptoren erreicht werden. Zu den länger anhaltenden Veränderungen gehören die Ausbildung neuer synaptischer Verknüpfungen, die Umorganisation bestehender Synapsen oder die Umstrukturierung ganzer Dendritenbäume. Plastische Veränderungen von Nervenzellen werden als zelluläre Grundlage für Lernvorgänge und Gedächtnisbildung angesehen. Als physiologisches Korrelat für plastische Veränderungen wird die so genannte Langzeitpotenzierung (LTP, *long-term potentiation*) von Neuronen diskutiert. Reizt man ein Neuron mit elektrischen Impulsen, so kommt es je nach Frequenz dieser Impulse bei einer erneuten Stimulation zu einem verstärkten exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP). Halten diese Veränderungen über einen längeren Zeitraum an, so spricht man von LTM (*long-term memory*; Kandel et al., 1995).

Lang anhaltende Veränderungen der synaptischen Effizienz gehen mit einer Änderung der Expression bestimmter Gene einher (z.B. Stork und Welzel, 1999; Tischmeyer und Grimm, 1999). Prinzipiell werden dabei zwei Gruppen von Genen unterschieden. Die einen werden sehr schnell (innerhalb von Minuten) aktiviert und ihre Transkription kann nicht durch Inhibitoren der Proteinsynthese blockiert werden. Man nennt diese Gene deshalb auch „*immediate-early genes*“ (IEG) (Sheng und Greenberg, 1990; Hughes und Dragunow, 1995; Herdegen und Leah, 1998). Viele dieser IEGs sind Transkriptionsfaktoren und regulieren die Expression einer Gruppe von Genen, die erst später transkribiert und deshalb auch als „*delayed-response genes*“ oder „*target genes*“ bezeichnet werden.

Die Expression der IEGs und die Induktion von LTP wird über die Aktivierung des N-methyl-D-aspartat-Rezeptors (NMDA-Rezeptor) stimuliert (z.B. Worley et al., 1990; Hisanaga et al., 1992; Sharp et al., 1993; Hughes und Dragunow, 1995; Platenik, 2000). Der NMDA-Rezeptor gehört neben dem *amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid*- (AMPA) und dem Kainat-Rezeptor zu den ionotropen Glutamat-Rezeptoren im zentralen Nervensystem. Die glutamatgesteuerten Ionenkanäle AMPA und Kainat öffnen sich schnell nach der Bindung eines Agonisten und erlauben meist den Einstrom von Natrium nicht aber von Calcium (Collingridge und Lester, 1989; Hollmann und

Heinemann, 1994; McBain und Mayer, 1994; Ozawa et al., 1998; Michaelis, 1998; Vallano, 1998). Die Aktivierungs- und Deaktivierungs-Kinetik der NMDA-Rezeptoren dagegen ist langsam und es können sowohl Natrium- als auch Calcium-Ionen aus dem Extrazellularraum eintreten. Darüber hinaus fungiert der NMDA-Rezeptor als ein so genannter Koinzidenzdetektor. Bei normalem Membranpotential wird er durch Magnesium-Kationen blockiert. Erst wenn die Bindung von Neurotransmittern mit einer Depolarisation der postsynaptischen Membran einhergeht, kommt es zur Öffnung des Kanals und zum Einstrom von Calcium. Calcium ist ein bekannter sekundärer Botenstoff (*second messenger*), der viele intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren kann und bekanntermaßen einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression im Zellkern hat (Ghosh und Greenberg, 1995; Clapham, 1995; Santella et al., 1997; Finkbeiner und Greenberg, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene IEGs untersucht, *c-fos* und *arg3.1*. Im Folgenden wird *c-fos* und *arg3.1* klein und kursiv geschrieben, wenn das Gen angesprochen ist, während für das Protein die jeweiligen Anfangsbuchstaben groß geschrieben werden (Arg3.1, c-Fos). C-Fos gehört zu den induzierbaren Transkriptionsfaktoren, d.h. c-Fos wird sehr schnell nach Aktivierung einer Nervenzelle gebildet und nach seiner Translation wieder in den Zellkern transportiert, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression nachgeschalteter Zielgene (*target genes*) reguliert (siehe Abb. 1.5). Die Gruppe der induzierbaren Transkriptionsfaktoren umfasst 3 Proteinfamilien: Fos, Jun und Krox (Herdegen und Leah, 1998). Fos- und Jun-Proteine dimerisieren über *leucine zipper* Motive, um den eigentlichen Transkriptionsfaktor AP1 (*activator protein 1*) zu bilden. Man nimmt an, dass induzierbare Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, ein Bindeglied zwischen kurzzeitiger neuronaler Aktivierung und anhaltenden Veränderungen darstellen. C-Fos wird häufig eingesetzt, um Aktivitätsmuster auf zellulärer Ebene zu untersuchen (Sagar et al., 1988; Dragunow und Faull, 1989). Zudem wurde postuliert, dass es an der Regulation der Gedächtnisbildung beteiligt ist (Kleim et al., 1996; Tischmeyer und Grimm, 1999). Dass c-Fos nicht nur ein neuronaler Aktivitätsmarker ist, zeigt sich auch darin, dass eine anhaltende Erregung der Neurone über NMDA-Rezeptoren nötig ist, um die Expression von *c-fos* zu stimulieren (z.B. Worley et al., 1990; Hisanaga et al., 1992; Sharp et al., 1993; Platenik et al., 2000).

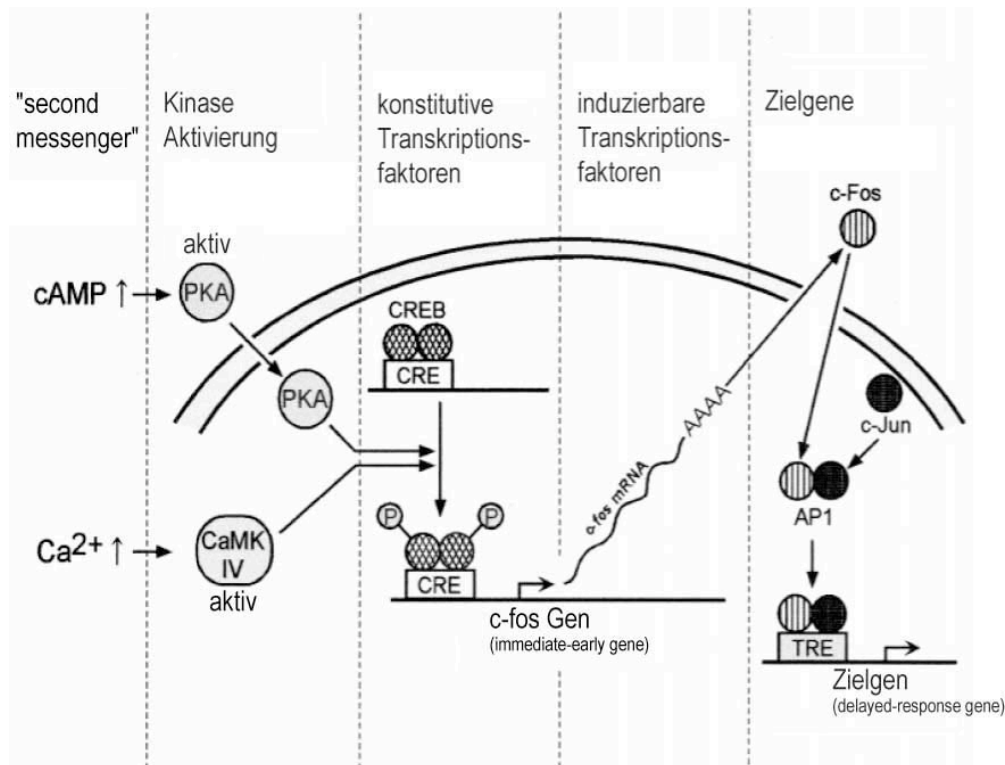


Abb.1.5 Vereinfachte Darstellung des Signalwegs von c-Fos

Über die Aktivierung des NMDA-Rezeptors erhöht sich die Menge der sekundären Botenstoffe (*second-messenger*) cAMP und Ca²⁺, über die es zur Phosphorylierung der Proteinkinase A (PKA) bzw. der Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMK) IV kommt. Beide Kinasen können das „*cAMP-response-element-binding*“ Protein (CREB) phosphorylieren, welches dann an die korrespondierende DNA-Konsensussequenz CRE (*cAMP-response element*) bindet und damit die Transkription von *c-fos* stimuliert. Nach der Translation wird das c-Fos-Protein wieder in den Zellkern transportiert, wo es mit c-Jun dimerisiert und somit zum eigentlichen Transkriptionsfaktor AP1 wird, der an die TRE-Sequenz bindet und darüber die Regulation der Zielgene übernimmt (Platenik, 2000).

Fleischmann et al. (2003) konnten darüber hinaus zeigen, dass in *c-fos* „*knock-out*“ Mäusen die Übertragung von Informationen ins Langzeitgedächtnis und die NMDA-Rezeptor abhängige synaptische Plastizität unterdrückt ist. Vergleicht man in einem Tier die c-Fos-Bildung mit der 2-Deoxyglucose-Methode (2-DG), so findet man c-Fos-Neurone nur in einem begrenzten Bereich der 2-DG Markierung (Reimer et al., 1993; Zuschratter et al., 1995). Dennoch wird c-Fos in vielen Neuronen schon nach einer einfachen und kurzfristigen Stimulation gebildet (z.B. Hunt et al., 1987; Ehret und Fischer, 1991; Friauf, 1992, Zuschratter et al. 1995). Daher kam die Frage auf, ob c-Fos wirklich ein Marker für plastische Veränderungen oder doch eher ein Aktivitätsmarker auf zellulärer Ebene ist. Obwohl die Rolle des c-Fos-Proteins an langanhaltenden Veränderungen von Nervenzellen bisher nicht vollständig geklärt ist, gab es verschiedene Gründe, dieses Protein in der

vorliegenden Arbeit zu untersuchen. Zum einen wurde die Verteilung des c-Fos-Proteins nach künstlicher Tinnitusinduktion in unserem Labor bereits im Detail untersucht (Oliva, 1997; Wallhäusser-Franke et al., 1997; Weller, 1998; Mahlke, 1999; Scheel, 2003; Wallhäusser-Franke et al., 2003), und die Bildung des c-Fos-Proteins konnte daher als interne Kontrolle für die Salicylatwirkung genutzt werden. Zum anderen diente die c-Fos-Bildung in den subcorticalen auditorischen Gebieten zur Überprüfung der Eingangsaktivität aus der Cochlea, da c-Fos nach akustischer Stimulation im CN und im IC in Übereinstimmung mit den tonotopen Gradienten gebildet wird (Ehret und Fischer, 1991; Friauf, 1992; Brown und Liu, 1995).

Da der Einfluss von c-Fos auf plastische Veränderungen von Nervenzellen eher indirekt ist, interessierte ich mich in dieser Arbeit für eine neue Gruppe von IEGs, die so genannten Effektorgene, denen ein direkter Einfluss auf anhaltende Veränderungen von Nervenzellen zugesprochen wird (Lanahan und Worley, 1998; Kuhl, 2000). Das am besten charakterisierte Proteinprodukt dieser Gruppe ist Arg3.1, oder auch Arc (*activity regulated cytoskeleton-associated protein*). *Arg3.1*-mRNA und Arg3.1-Protein werden nach synaptischer Aktivierung über einen NMDA-Rezeptor abhängigen Prozess hochreguliert (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Steward und Worley, 2001a). Ein Teil der *arg3.1*-mRNA wird direkt in die Dendriten transportiert und akkumuliert in der Nähe von aktivierten Synapsen (Link et al., 1995; Steward und Worley, 2001b). Dieser Prozess ist NMDA-Rezeptor abhängig und kann über die Zugabe von NMDA-Rezeptor Antagonisten blockiert werden (Steward und Worley, 2001a). Plath et al. (2003) konnten zeigen, dass Arg3.1 an die postsynaptische Membran, und dort an den NMDA-Rezeptor Komplex assoziiert ist. Eine Reihe von Untersuchungen weisen darauf hin, dass dendritische mRNAs auch in den Dendriten translatiert werden. Zum Beispiel werden Ribosomen über den ganzen dendritischen Baum verteilt gefunden und Polysomen sind an der Basis von dendritischen Fortsätzen (Spines) lokalisiert (Chicurel und Harris, 1992; Steward et al., 1996). Dass Arg3.1 eine wichtige Rolle bei anhaltenden Veränderungen von Nervenzellen spielt, wird auch durch Verhaltensversuche gezeigt, in denen verhaltensrelevante Erfahrungen zu einer massiven *arg3.1*-Expression im Vorderhirn von Ratten führt (Pinaud et al., 2001). Für diese Untersuchungen wurden Nager mit einer komplexen, neuen Umgebung konfrontiert, ein Paradigma, welches ursprünglich von Hebb (1949) etabliert wurde und häufig eingesetzt wird, um den Einfluss von Erfahrung auf die Funktion und synaptische Organisation des Gehirns zu demonstrieren (z.B. Greenough und Volkmar, 1973; Comery et al., 1995). Die stärksten und am häufigsten reproduzierten

morphologischen Veränderungen wurden in diesem Zusammenhang an der Postsynapse (*postsynaptic density*, PSD) beobachtet und resultierten in einer erhöhten Anzahl an perforierten PSDs (Greenough et al., 1978; Calverley und Jones, 1990). Perforierte PSDs werden als Vorstufe zur Teilung der PSDs und damit zur Bildung neuer Synapsen angesehen (Muller et al., 2000). Neben der Ausbildung neuer Synapsen kann es auch an bestehenden Synapsen zu strukturellen Veränderungen kommen. So wird zum Beispiel angenommen, dass die Erregbarkeit der postsynaptischen Membran unter anderem über den Ein- und Ausbau von AMPA-Rezeptoren reguliert werden kann (z.B. Turrigiano et al., 2000; Lu et al., 2001).

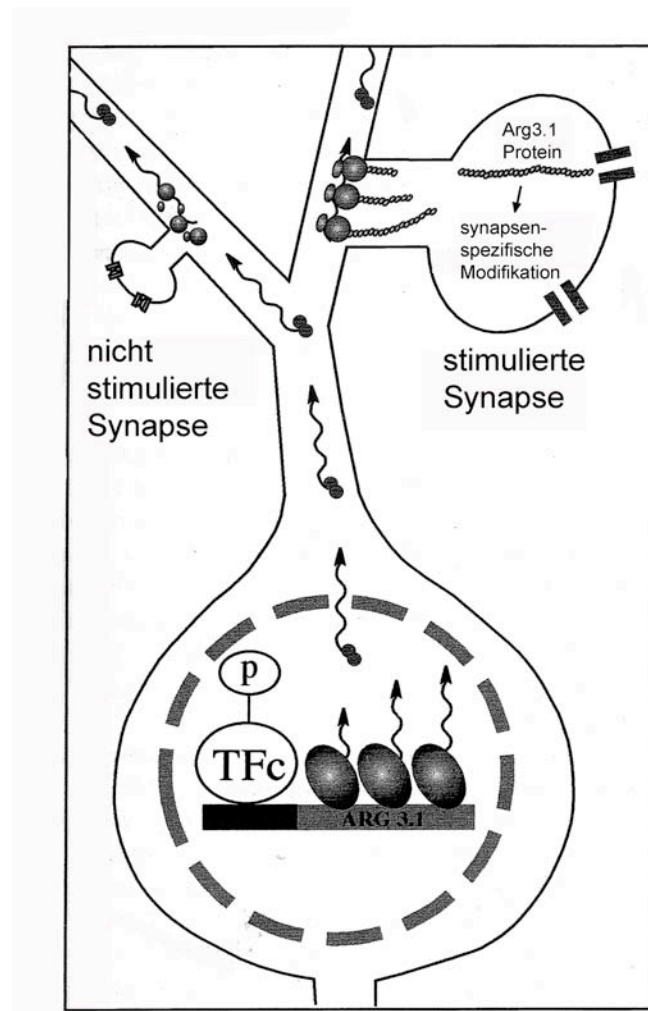


Abb.1.6 Model der synapsenspezifischen Modifikation nach aktivitätsinduzierter *arg3.1*-Expression

Die Phosphorylierung der konstitutionellen Transkriptionsfaktoren (TFc) führt zur induzierten Transkription der *arg3.1*-mRNA. Die neu synthetisierten *arg3.1*-Transkripte werden undifferenziert in alle dendritischen Spines transportiert. Eine verstärkte Translation des Arg3.1-Proteins findet nur in synaptischen Bereichen statt, die vorher aktiviert wurden (Kuhl, 2000).

Rial Verde et al. (2003) zeigten kürzlich, dass Arg3.1 am Recycling von AMPA-Rezeptoren beteiligt ist. Darüber hinaus unterstützen Ergebnisse aus Lernexperimenten mit Ratten die Hypothese, dass Arg3.1 für lang anhaltende Veränderungen benötigt wird. In diesen Versuchen wurde die Arg3.1-Bildung über die Zugabe von Oligonukleotiden unterdrückt. Dies führte zu einer verminderten räumlichen Erinnerungsfähigkeit in Verhaltensversuchen und verhinderte die Erhaltung der Langzeitpotenzierung (Guzowski et al., 2000). Übereinstimmend demonstrierten Plath et al. (2003) in einer Reihe von Verhaltensexperimenten mit *arg3.1* „knock-out“ Mäusen, dass Arg3.1 eine Schlüsselposition in der Übertragung von Informationen in das Langzeitgedächtnis einnimmt.

Obwohl die funktionelle Rolle des Arg3.1-Proteins noch nicht vollständig geklärt ist, weisen doch alle Befunde auf eine Lokalisation in den Dendriten, eine Assoziation mit dem Zytoskelett und damit auf einen direkten Einfluss von Arg3.1 auf strukturelle Veränderungen der postsynaptischen Membran als Antwort auf eine anhaltende Aktivierung eines Neurons hin. Solche strukturellen Veränderungen bilden die Grundlage anhaltender synaptischer Veränderungen und der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit interessierte ich mich für die Frage, ob neuronale Plastizität an der Entstehung von Tinnitus beteiligt ist und welche Hirnstrukturen von solchen Veränderungen betroffen sind. Da es nicht möglich ist, plastische Veränderungen von Nervenzellen in vielen verschiedenen Hirnregionen gleichzeitig zu untersuchen, nutzte ich eine indirekte Methode für den Nachweis der neuronalen Plastizität. Es ist bekannt, dass anhaltende, plastische Veränderungen von Nervenzellen mit der Bildung bestimmter plastizitätsrelevanter Proteine einhergehen (siehe 1.4). Daher untersuchte ich die Bildung zweier solcher Plastizitätsmarker, Arg3.1 und c-Fos, nach experimenteller Tinnitusauslösung im auditorischen und limbischen System Mongolischer Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*). Die Bildung des c-Fos-Proteins nach Tinnitusauslösung wurde bereits in früheren Experimenten untersucht und diente hier vornehmlich der internen Kontrolle. Zudem konnte über die c-Fos-Bildung die Eingangsaktivität im Nucleus cochlearis (CN) und Colliculus inferior (IC) überprüft werden (siehe 1.4). In allen Untersuchungen wurde Tinnitus über eine einmalige intraperitoneale Injektion einer Natriumsalicylatlösung ausgelöst. Dafür wurde eine Konzentration gewählt, die bei Ratten erwiesenermaßen zu einem Tinnitus führt (siehe 1.3.2)

Die folgenden Fragen wurden im Detail untersucht:

1. In welchen Gehirnstrukturen wird Arg3.1 nach experimenteller Tinnitusauslösung, im Vergleich zu einer akustischen Stimulation und einer Kontrollbehandlung mit einer Kochsalzlösung, gebildet?
2. Stimmt die Verteilung der Arg3.1-bildenden Neurone mit der Verteilung c-Fos bildender Neurone überein?
3. Kann die Bildung von Arg3.1 und c-Fos nach Salicylatinjektion über die simultane Gabe des muscarinergen Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin moduliert werden?
4. Kommt es nach Salicylatinjektion zu einer Kollokalisierung der *arg3.1*-mRNA und des Arg3.1-Proteins?
5. In welcher Klasse von Neuronen wird Arg3.1 nach Salicylatinjektion gebildet?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden Mongolische Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*) verwendet. Sie werden wie folgt in die Systematik eingeordnet:

<i>Klasse</i>	Mammalia,
<i>Ordnung</i>	Rodentia,
<i>Familie</i>	Cricetidae,
<i>Unterfamilie</i>	Gerbilinae (Rennmäuse),
<i>Gattung</i>	<i>Meriones</i> (Sand- oder Wüstenrennmäuse).



Abb. 2.1 Mongolische Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)

Mongolische Wüstenrennmäuse sind in den sandigen Steppen der Zentral-, Süd- und Nordost-Mongolei und im Norden und Nordosten Chinas sowie in einem kleinen Teil Südrusslands beheimatet. Sie sind einfach zu halten und zu züchten. Das Hörvermögen Mongolischer Wüstenrennmäuse ist im tieffrequenten Bereich mit dem des Menschen vergleichbar (Abb. 2.2). Sie eignen sich daher besonders gut für Untersuchungen des auditorischen Systems. Die biologische Bedeutung der Tieffrequenzwahrnehmung der Wüstenrennmäuse ist nicht genau bekannt, doch weiß man, dass diese Tiere sich durch

Klopfen mit den Hinterbeinen untereinander verständigen und diese Klopfgeräusche eher tieffrequenter Bereiche betreffen (Möller und Gerecht, 1979).

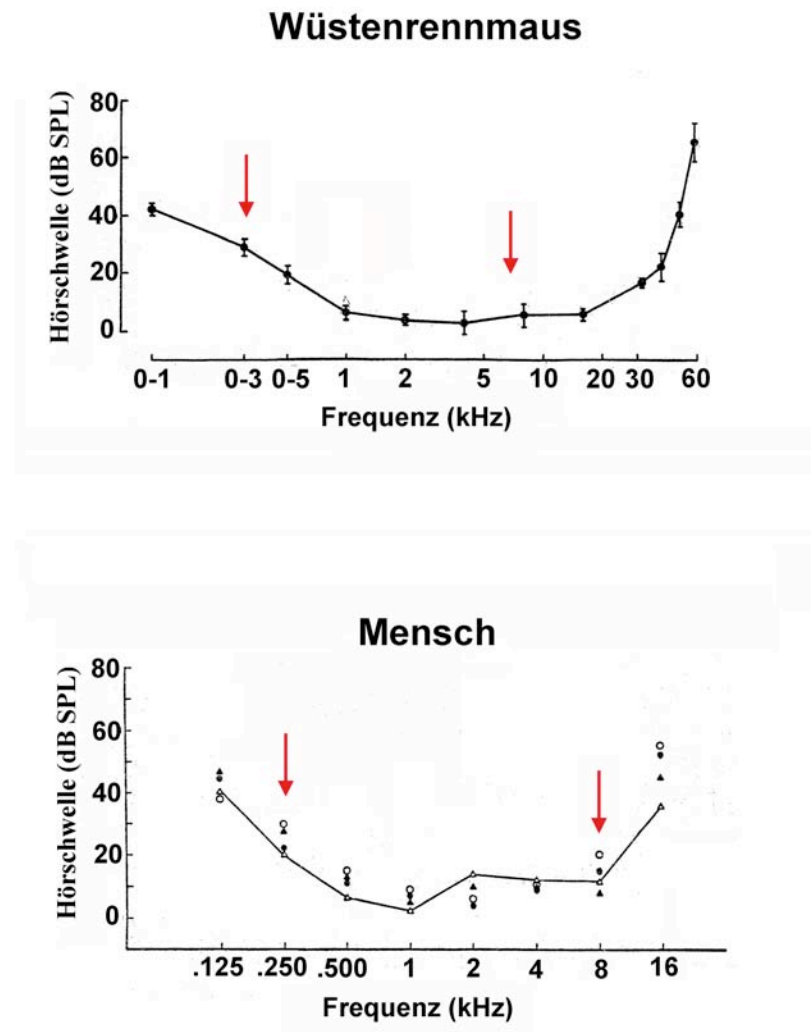


Abb. 2.2 Hörschwellenkurven der Mongolische Wüstenrennmaus (Ryan et al., 1976) und des Menschen (Owren et al., 1988)

Im Bereich zwischen 0,25 und 8 kHz zeigen beide Hörkurven einen ähnlichen Verlauf (rote Pfeile). Die Hörschwelle des Menschen steigt über 8 kHz stark an. Bei der Wüstenrennmaus kommt es erst ab ca. 20 kHz zu einer Verschlechterung des Hörvermögens. dB - dezibel; SPL = *sound pressure level*, kHz - Kilohertz

Für die vorliegende Arbeit wurden drei bis sechs Monate alte, weibliche und männliche Wüstenrennmäuse mit einem mittleren Gewicht von 60-80 g aus der institutseigenen Zucht verwendet. Alle Tiere wurden in Gruppen in einem künstlichen 12 Stunden hell/dunkel Rhythmus gehalten. Wasser und Futter (Heu und Pellets) stand ihnen jederzeit zur Verfügung. Insgesamt wurden 50 Tiere in vier verschiedenen Versuchsreihen behandelt (siehe Tab. 2.1). In Versuchsreihe 1 wurden die Proteine der „*immediate-early genes*“ (IEG) *arg3.1* und *c-fos* nach Salicylatinjektion untersucht und mit der Bildung der Proteine nach akustischer Stimulation oder Injektion mit einer physiologischen Kochsalzlösung (Saline) verglichen. In Versuchsreihe 2 wurde untersucht, inwieweit die Bildung des Arg3.1 und c-Fos-Proteins nach Salicylatinjektion durch die gleichzeitige Gabe des Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin beeinflusst wird. Die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylatgabe wurde in Versuchsreihe 3 mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. In Versuchsreihe 4 erfolgte eine nähere Charakterisierung der Arg3.1-bildenden Neurone über Fluoreszenz-Doppelfärbungen.

Alle Experimente wurden unter Einhaltung der europäischen und deutschen Richtlinien für die Versorgung und Behandlung von Labortieren durchgeführt. Die Versuchsprotokolle wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt.

Versuchs- reihe	Tier	Versuchs- gruppe	Zuchtlinie	Geschlecht	Behandlung
1	CM 26	2	L 13 I	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 27	3	L 13 I	männlich	Saline
	CM 28	1	L 13 I	männlich	Stimulation; NBW- 8 kHz
	CM 29	2	L II	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 30	3	L II	männlich	Saline
	CM 31	1	L II	männlich	Stimulation; NBW- 8 kHz
	CM 32	2	L 9	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 33	3	L 9	weiblich	Saline
	CM 34	1	L 9	weiblich	Stimulation, NBW- 8 kHz
	CM 35	2	L 7	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 36	3	L 7	männlich	Saline
	CM 37	1	L 7	männlich	Stimulation, NBW- 1 kHz
	CM 38	2	L 7	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 39	3	L 7	weiblich	Saline
	CM 40	1	L 7	weiblich	Stimulation, NBW- 1 kHz
	CM 41	2	L 7	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 42	3	L 7	weiblich	Saline
	CM 43	1	L 7	weiblich	Stimulation, NBW- 1 kHz
	CM 44	5	F 14 I	weiblich	Saline
	CM 46	4	F 14 V	weiblich	Salicylate 350 mg/kg
	CM 47	5	F 14 V	weiblich	Saline
	CM 53	4	F 14 IV	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 54	5	F 14 IV	weiblich	Saline
	CM 55	4	F 14 I	männlich	Salicylat 350 mg/kg
2	CM 84	6	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 85	7	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg /kg + Scopolamin 5 mg/kg
	CM 86	6	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 87	7	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg /kg + Scopolamin 5 mg/kg
	CM 88	6	CR V	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 89	7	CR V	männlich	Salicylat 350 mg /kg + Scopolamin 3 mg/kg
	CM 90	6	CR V	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 91	7	CR V	männlich	Salicylat 350 mg /kg + Scopolamin 3 mg/kg
3	CM 74	8	F 15 IV	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 75	9	F 15 IV	weiblich	Saline
	CM 76	8	F 15 IV	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 77	8	CR II	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 78	8	CR II	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 79	9	CR II	männlich	Saline
4	CM 57	10	F 15 IV	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 61	10	F 15 III	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 68	10	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 80	10	CR VI	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 81	10	CR VI	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 82	10	CR VI	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 83	10	CR VI	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 84	10	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 86	10	F 15 V	weiblich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 88	10	CR V	männlich	Salicylat 350 mg/kg
	CM 90	10	CR V	männlich	Salicylat 350 mg/kg

Tab. 2.1 Auflistung aller in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Versuchstiere

2.2 Versuchsreihe 1: Immunhistochemischer Nachweis des Arg3.1- und c-Fos-Proteins nach akustischer Stimulation, Salicylat- und Salineinjektion

2.2.1 Behandlung der Versuchstiere

Für Versuchsreihe 1 wurden 24 Tiere in fünf Gruppen behandelt.

- Gruppe 1:** akustische Stimulation; n= 6
- Gruppe 2:** Salicylatinjektion (+ laute Umgebungsgeräusche); n= 6
- Gruppe 3:** Salineinjektion (+ laute Umgebungsgeräusche); n= 6
- Gruppe 4:** Salicylatinjektion (+ normale Umgebungsgeräusche); n= 3
- Gruppe 5:** Salineinjektion (+ normale Umgebungsgeräusche); n= 3

Tiere der Gruppe 1 wurden am Tag vor dem Experiment einzeln in einem Haltungskäfig in eine schallgedämpfte Kammer überführt. Am nächsten Tag wurde ihnen ein schmalbandiges weißes Rauschen (NBW, *narrow band white noise*; Mittenfrequenz \pm 1/3 Oktave) zentriert um 8 kHz (NBW-8 kHz; n=3) oder 1 kHz (NBW-1 kHz; n=3) präsentiert. Die akustischen Stimuli wurden digital erzeugt und verarbeitet (Tucker Davis Technologies, Gainesville, Florida). Die Präsentation der Stimuli erfolgte in 200-ms-Pulsen mit einer Rampe von 5 ms, gefolgt von einer 800 ms langen Pause. Insgesamt wurde der Stimulus 600-mal in 10 min, mittels einem über dem Käfig angebrachten Lautsprecher (2445J; James B. Lansing Sound Inc., California) angeboten. Der Schalldruckpegel betrug 80 \pm 5 dB SPL und wurde vor den Experimenten in jeder Ecke und in der Mitte des Käfigs überprüft (Bruel & Kjaer Microphone 4133). Zusätzlich wurde die Stimuluspräsentation visuell über einen Frequenzanalysator (Bruel & Kjaer 2033) und ein Oszilloskop (Hewlett Packard 54601B 100 MHz) überwacht. Nach der Stimulation blieben die Tiere bis zur Perfusion in der schallgedämpften Kammer.

Tiere der Gruppe 2 und 3 wurden am Tag vor den Experimenten einzeln in Käfige gesetzt, blieben aber während der Experimente in ihrer gewohnten Umgebung. Durch dieses Vorgehen sollte zusätzlicher Stress durch eine neue Umgebung vermieden werden. Tiere der Gruppe 2 (n=6) erhielten eine einmalige intraperitoneale Injektion mit Natriumsalicylat

(Sigma, im folgenden als Salicylat bezeichnet) gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen). Die Dosis betrug 350 mg/kg Körpergewicht und die Lösung wurde so angesetzt, dass eine 100 g schwere Wüstenrennmaus ein Volumen von 0,5 ml gespritzt bekam. Alle Tiere wurden direkt vor der Injektion gewogen und bekamen ein ihrem Körpergewicht entsprechendes Volumen der Salicylatlösung injiziert. Tiere der Gruppe 3 (n=6) wurden identisch behandelt und bekamen ein entsprechendes Volumen an physiologischer Kochsalzlösung (Saline) injiziert. Alle Tiere der Gruppen 2 und 3 blieben bis zur Perfusion im Tierstall. An sechs aufeinander folgenden Tagen wurden pro Tag jeweils drei Geschwistertiere gleichen Geschlechts behandelt (Tab. 1), eines pro Versuchsgruppe. Insgesamt wurden neun weibliche und neun männliche Tiere untersucht. Um Einflüsse durch tageszeitliche Schwankungen auszuschließen, wurden die Experimente an jedem Tag zur selben Zeit durchgeführt.

Im Vergleich zu früheren Untersuchungen (Wallhäusser-Franke et al., 2003) zeigten die Tiere der Gruppe 3 (Saline) eine unerwartet hohe Menge an c-Fos bildenden Neuronen im auditorischen Cortex. Da die Tiere aus Gruppe 2 und 3 während der Experimente im Tierstall verblieben und in der Nähe des Stalls zu dieser Zeit Bauarbeiten durchgeführt wurden, kann angenommen werden, dass die ungewöhnlich lauten Umgebungsgeräusche zu einer unspezifischen akustischen Stimulation geführt hatten. Um diese Annahme zu überprüfen wurden sechs weitere Tiere einige Zeit nach Beendigung der Bauarbeiten mit Salicylat (Gruppe 4; n=3) oder Saline (Gruppe 5; n=3) behandelt.

2.2.2 Perfusion

Der Zeitpunkt für die Perfusionen wurde so gewählt, dass die Bildung des Arg3.1 und c-Fos-Proteins maximal war. Ab zwei Stunden nach Salicylatinjektion erreicht der Hörschaden ein für einige Stunden stabiles Maximum (Müller et al., 2003). Die c-Fos Produktion ist drei bis vier Stunden nach Salicylatinjektion maximal (Wallhäusser-Franke et al., 1997; Wallhäusser-Franke et al., 2003). Für Arg3.1 wurde gezeigt, dass die Bildung des Proteins drei bis vier Stunden nach künstlich ausgelösten epileptischen Anfällen am höchsten war. Dementsprechend wurde der Zeitraum zwischen Salicylatinjektion und Perfusion auf fünf Stunden verlängert, zwei Stunden bis zur vollen Entfaltung der Salicylatwirkung plus drei Stunden für die Proteinbildung. Die akustisch stimulierten Tiere wurden entsprechend exakt drei Stunden nach der Stimulation perfundiert.

Für die Perfusion wurden die Tiere tief betäubt (Ketavet, Pharmacia/ Rompun, Bayer). Erst wenn kein Schmerzreflex mehr vorhanden war, wurde der Brustraum geöffnet. Um Blutgerinnungsprozessen vorzubeugen, wurde 0,1 ml Liquemin (N 25 000, Roche) in die linke Herzkammer injiziert. Danach wurde eine Kanüle in die linke Herzkammer eingebracht und das Blut mit einer 0,1 M Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (KPBS, pH 7,4) aus dem Kreislaufsystem ausgewaschen. Damit das Blut abfließen konnte, wurde der rechte Vorhof angeschnitten. Anschließend wurde das Gewebe über den Blutkreislauf mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung (in KPBS 0,1 M, pH 7,4 + 0.025 % Glutardialdehyd und 10 Tropfen gesättigte Pikrinsäure pro 500 ml) fixiert. Die Gehirne wurden herauspräpariert und für drei Stunden bei Raumtemperatur in oben genanntem Fixativ nachfixiert. Danach wurden sie in Puffer (KPBS 0,1 M) überführt und im Kühlschrank bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.2.3 Immunhistochemie

Mit einem Vibratom wurden von allen Gehirnen 50 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt. Um Abweichungen in der Anzahl der markierten Neurone durch unterschiedliche Lösungen zu vermeiden, wurde das Gewebe der 18 Tiere in zwei Chargen behandelt. Jede Charge enthielt Gewebe von neun Tieren, jeweils drei aus den Gruppen 1-3, die zeitgleich und mit den gleichen Lösungen behandelt wurden. Um die jeweiligen Proteine zu detektieren, wurde ein klassisches immunhistochemisches Verfahren verwendet. Aufeinander folgende Schnitte wurden mit einem polyklonalen anti-c-Fos bzw. einem polyklonalen anti-Arg3.1-Antikörper (Primärantikörper) inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem jeweiligen biotinylierten 2. Antikörper (Sekundärantikörper). Über ein Streptavidin-Peroxidase System wurde dann das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) oxidiert und somit die Lokalisation der Proteine sichtbar gemacht (siehe Versuchsprotokoll). Die Spezifität der Antikörperbindung wurde durch Auslassen der primären Antikörper, bzw. einer Vorinkubation des primären anti-Arg3.1-Antikörpers mit dem dazugehörigen Blockingpeptid (Arc P sc-6381, Santa Cruz) überprüft. Die Behandlung des Gewebes der Tiere aus den Gruppen 4 und 5 wurde zu einem späteren Zeitpunkt, unter Verwendung der gleichen Antikörper und des gleichen Versuchsprotokolls, durchgeführt.

Versuchsprotokoll:

- 3x waschen in KPBS 0,1 M (pH 7,4)
- Inkubation mit den Primärantikörpern für 64 h bei 4°C
anti-Arg3.1 (sc-6381, Lot# F140, 1:500, Santa Cruz), 1 :500;
anti-c-Fos (sc-52, Lot# J278 , 1:1000; Santa Cruz), 1 :1000;
- 3x waschen in KPBS 0,1 M (pH 7,4)
- Inkubation mit dem biotinylierten Sekundärantikörper für 2 h bei Raumtemperatur (RT);
für anti-Arg3.1 aus der Ziege: anti-Ziege (B-7014, Sigma-Aldrich), 1 :100
für anti-c-Fos aus dem Hasen: anti-Hase (B-7389, Sigma-Aldrich), 1 :100
- drei mal waschen in KPBS 0,1 M (pH 7,4)
- Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin für 1 h bei RT
für Arg3.1: Vectastain Elite ABC Kit (PK- 6100, Vector Laboratories)
für c-Fos: Vectastain ABC Kit (PK- 4000, Vector Laboratories)
- 3x waschen in KPBS 0,1 M (pH 7,4)
- Inkubation mit DAB (SK- 4100; Vector Laboratories) für 2-5 min bei RT
- 2x waschen in KPBS 0,1 M (pH 7,4)
- 1x waschen in Leitungswasser
- Aufziehen der Schnitte auf gelatinierte Objektträger
- Entwässern der Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt (O. Kindler)

Verwendete Lösungen :**Kaliumphosphatpuffer: KPBS 0,1M pH 7,4**

Stammlösung 1M:.

KCL	2g	
KH ₂ PO ₄	2g	
NaCl	80g	
Na ₂ HPO ₄	11,5g	ad 1 Liter H ₂ O bidest

Für den Gebrauch wurde die Lösung 1:10 verdünnt

2.2.4 Auswertung

Für alle Tiere der Gruppen 1-3 wurden die Arg3.1 immunreaktiven Neurone, im folgenden Arg3.1-Neurone genannt, in den tonotop organisierten Feldern AI (primäres auditorisches Feld) und AAF (anteriores auditorisches Feld) des auditorischen Cortex (AC), dem Gyrus cinguli (CG) und der Amygdala quantifiziert. Für jede Region wurden pro Tier sechs Schnitte ausgewertet und die Anzahl an Arg3.1-Neuronen separat in beiden Hemisphären bestimmt. In denselben Gehirnen wurden c-Fos-Neurone im ventralen Nucleus cochlearis (VCN), im Colliculus inferior (IC) und in der Amygdala gezählt. Die c-Fos Immunreaktivität im AC wurde in der vorliegenden Arbeit nur qualitativ bewertet. In Tieren der 2. Versuchsreihe wurden die Arg3.1-Neurone im AC und der Amygdala, die c-Fos-Neurone im VCN, im AC und in der Amygdala qualitativ untersucht. Auf eine systematische Untersuchung des DCN und MGB musste in der vorliegenden Arbeit verzichtet werden, da die gleichzeitige immunhistochemische Behandlung des Gewebes von jeweils neuen Tieren nur eine begrenzte Anzahl an Schnitten zuließ.

2.2.4.1 Bestimmung der ausgewerteten Gebiete

Die Lokalisation und Organisation des AC der Mongolische Wüstenrennmaus ist im Detail bekannt (Scheich et al., 1993; Thomas et al., 1993; Budinger et al., 2000a) und erleichterte die Auswahl der richtigen Schnitte für die Quantifizierung der Arg3.1-Neurone in AI und AAF. Alle Schnitte wurden aus einem Bereich zwischen 500 und 1500 μm ventral zum dorsalen Beginn des Putamen caudatum (CPu) genommen. In Abb. 2.2 ist ein Beispielschnitt aus diesem Bereich dargestellt. Die beiden primären auditorischen Felder AI und AAF sind in dieser Region vorhanden und zeigen eine nahezu spiegelbildliche Organisation der Tonotopie.

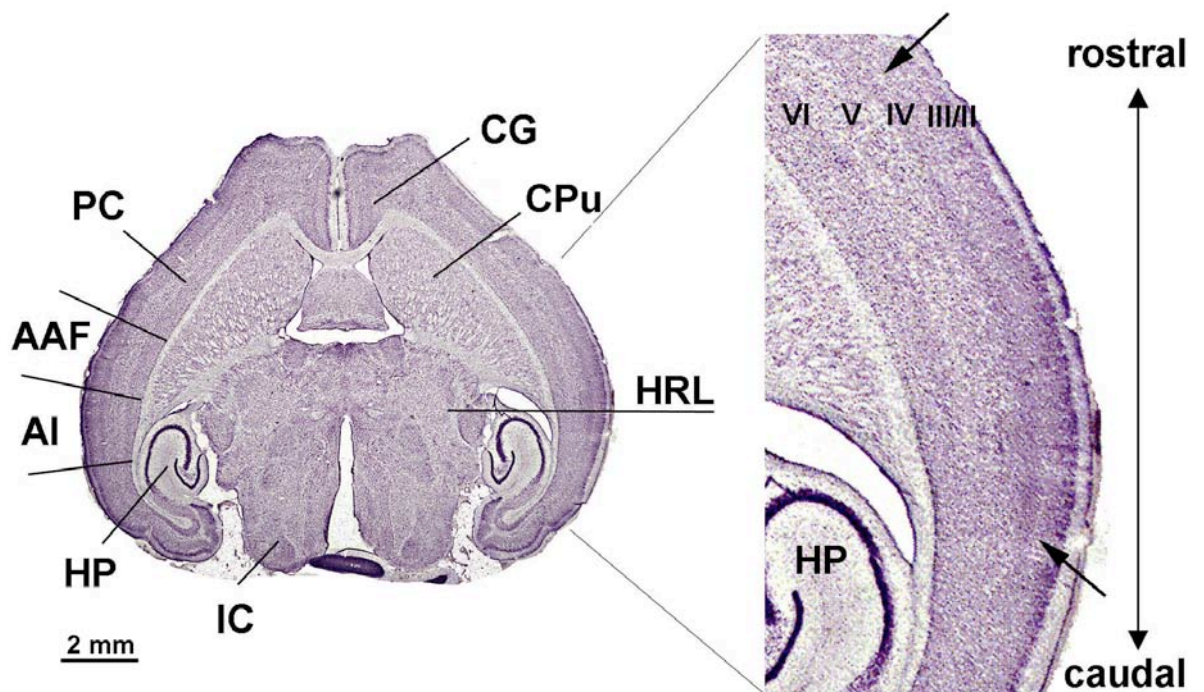


Abb. 2.3 Übersicht der ausgewerteten Gebiete aus dem Bereich AC und CG

Der dargestellte Nissl-gefärbte Horizontalschnitt zeigt einen Bereich zwischen 500 und 1500 μm ventral zum dorsalen Beginn des Putamen caudatum (CPu). In diesem Bereich ist die Tonotopie in AI und AAF nahezu spiegelbildlich. AI und AAF besitzen eine gemeinsame hochfrequente Grenze. Rechts ist eine Ausschnittsvergrößerung des rechten AC dargestellt. Die Felder AI und AAF besitzen in der corticalen Schicht IV eine hohe Neuronendichte. Das caudale Ende von AI und das rostrale Ende von AAF sind durch Pfeile angezeigt. Im CG (linkes Bild) sind die Neurone deutlich in Schichten angeordnet. AAF - anteriores auditorisches Feld, AI - primäres auditorisches Feld, CG - Gyrus cinguli, IC - Colliculus inferior, HP - Hippocampus, HRL - Hippocampus-Referenzlinie, PC - Parietalcortex, Str - Striatum

Als zusätzlich Orientierung diente die Hippocampus-Referenzlinie (HRL) und eine Einbuchtung in der Gehirnoberfläche ca. 0,5 mm rostral von AAF. Die HRL liegt auf der Höhe des rostralen Pols des Hippocampus und stimmt laut Scheich et al. (1993) ungefähr mit der 1 kHz Isofrequenz-Bande überein. Um die HRL zu konstruieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden rostralen Pole des Hippokampus miteinander verbunden und diese Linie über den Cortexrand hinaus verlängert. Die Felder AI und AAF zeichnen sich darüber hinaus durch eine besonders hohe Dichte an Neuronen in Schicht IV, der Eingangsschicht der thalamischen Afferenzen, in Nissl-Präparaten aus (siehe 2.4.3 und Abb.2.3).

In denselben Schnitten wurden markierte Neurone im CG untersucht. Nach Zilles und Wree (1995) umfasst der präfrontale Cortex die so genannten orbitalen, agranulär insulären und die cingulären Gebiete (CG1-3). Laut Budinger und Scheich (2003) zeigen die Gebiete CG 1-3 eine laminäre Anordnung, die von CG2 über CG3 zu CG1 immer deutlicher wird. Der Vergleich mit Nissl-gefärbten Schnitten aus dieser Region zeigte, dass es sich bei den von mir ausgewerteten Bereichen um die Gebiete CG2 und CG3 handelte (Budinger, pers. Mitteilung).

Für die Auswertung des IC wurden die Schnitte so gewählt, dass c-Fos-Neurone in vergleichbaren Bereichen des IC gezählt wurden. Diese Bereiche lagen immer 400 µm dorsal bis 600 µm ventral zum dorsalen Beginn des CP. Da man die Grenzen zwischen dorsalem und zentralem IC in Horizontalschnitten schlecht erkennen kann, wurden c-Fos-Neurone aus beiden Bereichen zusammengefasst.

Der VCN konnte klar in den anterioren (AVCN) und den posterioren VCN (PVCN) unterteilt werden. Die c-Fos-Neurone wurden für beide Bereiche separat bestimmt. Die Untereinheiten der Amygdala wurden mit Hilfe des Rattenatlas (Paxinos und Watson, 1986) und dem Vergleich zu Nissl-gefärbten Schnitten identifiziert (Abb.2.3).

C-Fos- und Arg3.1-Neurone wurden in der zentralen (CeA), der medialen (MeA) und der lateralen Amygdala (LA) untersucht. Da die Grenzen zwischen der lateralen und der basolateralen Amygdala in den Horizontalschnitten schwer zu bestimmen waren, wurden auch hier beide Bereiche zusammen ausgezählt.

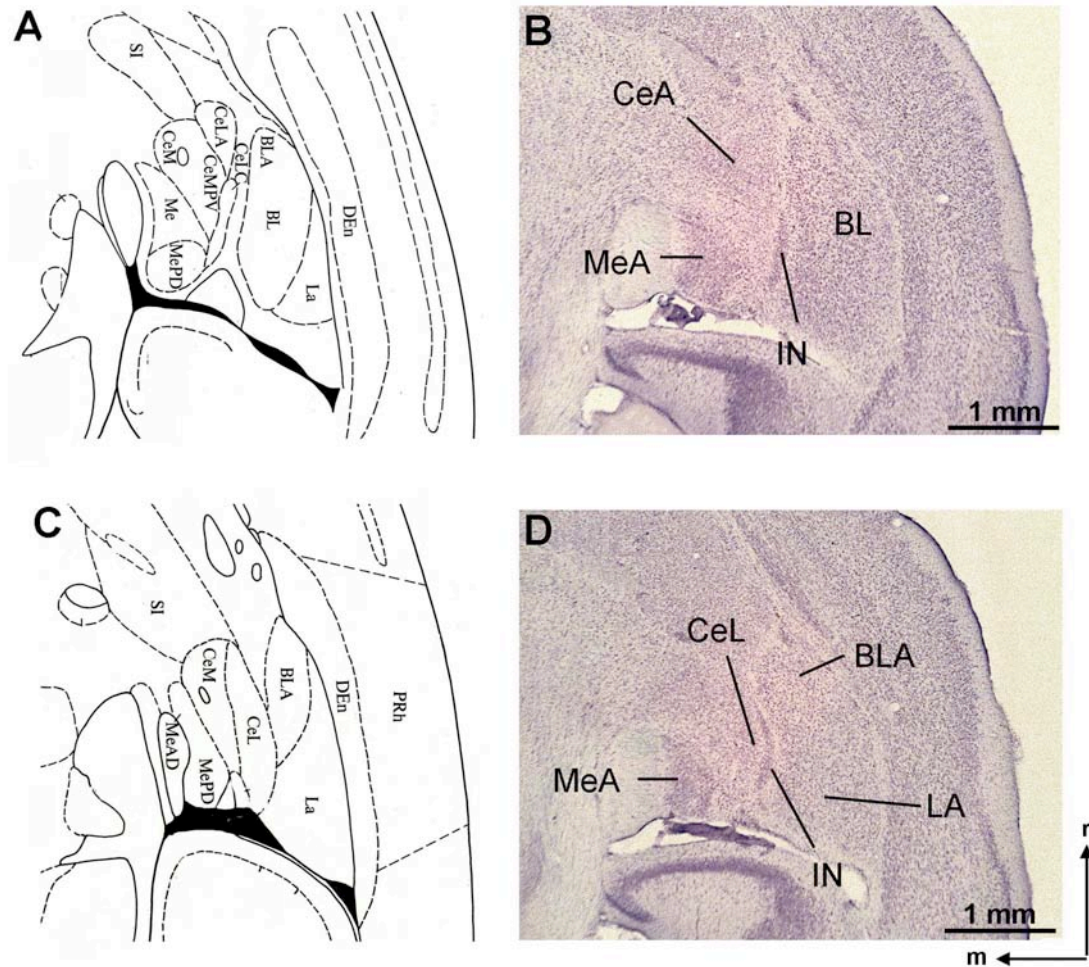


Abb.2.4 Übersicht der ausgewerteten Untereinheiten der Amygdala

A+C: Ausschnittsvergrößerungen von Horizontalschnitten der Ratte im Bereich der Amygdala (Rattenatlas von Paxinos und Watson, 1986). Der in **A** gezeigte Bereich liegt ca. 300 µm weiter ventral, als der in **C** gezeigte. Man erkennt deutlich, dass sich CeA in ventrodorsaler Ausdehnung von rostral nach caudal bewegt. **B+D:** Nissl-gefärbte Horizontalschnitte aus den in **A+C** repräsentierten Bereichen. Die Lage und die Abgrenzungen zwischen den Hirnregionen ist in Ratten- und Wüstenrennmäusen vergleichbar. Allerdings ist der IN, der auf den Schnitten aus dem Rattenatlas nicht eingezeichnet ist, bei der Wüstenrennmaus deutlicher ausgeprägt als bei der Ratte. Die laterale Untereinheit der zentralen Amygdala befindet sich medial des IN. CeA - zentrale Amygdala, CeL - laterale Untereinheit der zentralen Amygdala, BLA - basolaterale Amygdala, BL - basale laterale Amygdala, dEn - dorsaler entorhinaler Cortex, IN - interkalierender Nucleus der Amygdala, LA - laterale Amygdala, MeAD - anteriorer dorsaler Teil der medialen Amygdala, MePD posteriorer - dorsaler Teil der medialen Amygdala, PRh - perirhinaler Cortex, SI - Substantia innominata

2.2.4.2 *Quantitative und qualitative Auswertung*

Für die quantitative Auswertung wurden alle Schnitte codiert. So wurde gewährleistet, dass ein Schnitt bei der Auswertung weder einem bestimmten Tier, noch einer Behandlungsgruppe zugeordnet werden konnte. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines computergesteuerten Mikroskops mit Motortisch (Leitz, Orthoplan), wodurch eine genaue anatomische Lokalisation der markierten Neurone gewährleistet wurde. Computerzeichnungen der Horizontalschnitte wurden aus den aufgezeichneten Daten mit Hilfe des Programms Scan Space, Version 4.0 (Norbert Tönder) erstellt und mit dem Programm IDL 5.0 in tiff- Dateien umgewandelt.

In den so erstellten Zeichnungen einzelner Hirnschnitte traten lokale Anhäufungen der Arg3.1-Neurone entlang der rostro-caudalen Ausdehnung des AC auf. Um die genaue Position dieser lokalen Maxima zu bestimmen, wurden die Computerzeichnungen von jeweils sechs Schnitten mit Hilfe des Programms Photoshop (6.0) übereinander projiziert (Abb. 3.3). In den resultierenden Bildern wurden die Pixel entlang der medio-lateralen Ausbreitung des gesamten AC mit Hilfe eines auf Matlab (6.5) basierenden Auswerteprogramms gezählt. Dabei entsprach ein Pixel einem markierten Neuron. Die ermittelte Zellzahl wurde gegen die rostro-caudale Ausbreitung in Abhängigkeit zur HRL aufgetragen (Abb. 3.3). Um eine bessere Bestimmung der Maxima zu gewährleisten, wurden die resultierenden Kurven über fünf Datenpunkte gemittelt. Abbildung 3.4 gibt einen Überblick über die Verteilung der lokalen Maxima in den verschiedenen Versuchsgruppen. Die Maxima wurden in Abhängigkeit zur HRL für vier akustisch stimulierte und fünf mit Salicylat behandelte Tiere aufgetragen. Dabei wurden nur Maxima berücksichtigt, die zwischen dem Maximum und den benachbarten Minima Differenzen von mindestens fünf Pixeln, entsprechend fünf Neuronen, aufwiesen.

Für die statistische Auswertung wurde die mittlere Anzahl an markierten Neuronen pro Schnitt aus jeweils sechs Schnitten pro Gebiet ermittelt. Da es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hemisphären gab, wurde ein Mittelwert aus beiden Hemisphären gebildet. Die Anzahl der markierten Neurone aus Gruppe 2 (Salicylat) wurde mit dem Mann-Whitney U-Test gegen die Anzahl der markierten Neurone aus den Gruppen 1 (akustische Stimulation), bzw. Gruppe 3 (Saline+ laute Umgebungsgeräusche) getestet.

Da nach Salicylatinjektion auffällig viele Arg3.1-Neurone an der Grenze zwischen AI und AAF vorlagen, wurden die Anzahl der Neurone in diesem Bereich separat bestimmt und

durch die Gesamtzahl der Arg3.1-Neurone im AC geteilt. Die so ermittelte Häufigkeit, mit der Arg3.1-Neurone nach Salicylatinjektion im hochfrequenten Bereich vorlagen, wurde mit dem Mann-Whitney U-Test gegen die Häufigkeit getestet, mit der die Arg3.1-Neurone nach den anderen beiden Behandlungen in diesem Bereich vorkamen. Der Bereich wurde so gewählt, dass alle Neurone gezählt wurden, die sich in einem Abstand von 0,5 mm bis 1,5 mm rostral der HRL befanden. Die Auswertgrenzen verliefen dabei parallel zur HRL.

2.2.4.3 Mann-Whitney U-Test

Um Unterschiede zwischen den Gruppen zu testen, wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Mit dem Test von Mann-Whitney (1947) wird geprüft, ob zwei unabhängige Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Er ist verteilungsunabhängig, empfindlich gegenüber Medianunterschieden und empfindlich für Varianzunterschiede.

Der U-Test ist ein Rangtest. Es wird vorausgesetzt, dass die Werte der Stichproben nach ihrer Größe geordnet sind, d.h. die Beobachtungen aus beiden Stichproben (N_1, N_2) werden zu einer Stichprobe zusammengefasst und der Größe nach geordnet. Jedem Stichprobenwert wird eine Rangzahl zugeordnet und dazu vermerkt, aus welcher der beiden Stichproben der Wert stammt. Die Summe der Rangzahlen aus Stichprobe 1 heißt R_1 , die Summe der Rangzahlen aus Stichprobe 2 heißt R_2 . Die Prüfgrößen U_1 und U_2 errechnen sich dann folgendermaßen:

$$U_1 = N_1 N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_1 + U_2 = N_1 N_2$$

$$U_2 = N_1 N_2 + \frac{N_2(N_2 + 1)}{2} - R_2$$

(aus Sachs, 2002)

Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden Größen U_1 und U_2 . Die Nullhypothese wird verworfen, wenn der berechnete U-Wert kleiner oder gleich dem kritischen U-Wert $U(N_1, N_2)$ ist, den man in einer entsprechenden Tabelle nachschlagen kann.

2.3 Versuchsreihe 2: Einfluss des Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin auf die Arg3.1- und c-Fos-Produktion nach Salicylatinjektion

Scopolamin zählt, wie Atropin, zu den natürlichen Alkaloiden der Nachtschattengewächse (Solanaceen). Beide Alkaloide blockieren selektiv die muscarinergen Acetylcholinrezeptoren und passieren gut die Blut-Hirnschranke. Scopolamin zeigt jedoch, im Gegensatz zu Atropin, geringere periphere Nebenwirkungen (Lüllmann et al., 1996). Für diesen Versuch wurden acht Tiere, vier männliche und vier weibliche (Tab. 2.1), in zwei Gruppen behandelt. Tiere der Gruppe 6 wurden mit Salicylat (350 mg/kg, siehe auch 2.2.1; n=4), Tiere der Gruppe 7 mit Salicylat und Scopolaminhydrobromid (S1875, Sigma; n=4) behandelt. Für die Behandlung wurden 10 ml Salicylatlösung angesetzt (70mg/ml physiologische Kochsalzlösung). In 5 ml dieser Lösung wurden 3 (n=2) bzw. 5 mg (n=2) Scopolaminhydrobromid gelöst.

Alle Tiere wurden am Tag vor dem Experiment einzeln in Käfige gesetzt und blieben nach der Behandlung im Tierstall bis zur Perfusion, die jeweils genau fünf Stunden später erfolgte. Die Tiere wurden immer in Paaren behandelt, jeweils eins aus jeder Gruppe. Dementsprechend wurde auch das Gewebe dieser Tiere mit denselben Lösungen inkubiert. Perfusion und immunhistochemischer Nachweis des Arg3.1 und c-Fos-Proteins folgten den unter 2.2.1, 2.2.2 und 2.2.3 beschriebenen Protokollen. Für diese Experimente wurden Primärantikörper anderer Chargen benutzt; für Arg3.1 ein Antikörper der Charge C292 (1:500) und für c-Fos der Charge K 188 (1:2000). Anzahl und Verteilung der Arg3.1 und c-Fos bildenden Neurone wurde qualitativ in den Feldern AI und AAF, in CG und in der Amygdala untersucht. Die Auswahl der Schnitte erfolgte wie unter 2.2.4.1 beschrieben.

2.4 Versuchsreihe 3: Nachweis der *arg3.1*-mRNA nach Salicylat-injektion durch eine radioaktive *in situ*-Hybridisierung

2.4.1 Behandlung der Versuchstiere

Tiere der Versuchsreihe 3 wurden entweder mit Salicylat (350 mg/kg; Gruppe 8; n=4), oder mit einem entsprechenden Volumen einer physiologischen Kochsalzlösung (Saline; Gruppe 9; n=2) behandelt (siehe auch Tab.1). Alle Tiere wurden am Tag vor der Behandlung einzeln in Käfige gesetzt. Drei Tiere (2x Salicylat, 1x Saline) wurden jeweils am gleichen Tag behandelt. Zwei Stunden nach der Behandlung wurden die Tiere tief betäubt (Ketavet/ Rompun) und dekapitiert. Alle Gehirne wurden sofort nach der Präparation mittels flüssigen Stickstoffs eingefroren. Um eine direkte Berührung des Gewebes mit dem flüssigen Stickstoff zu vermeiden, wurde das Gehirn auf einen metallenen Deckel gelegt, der auf dem flüssigen Stickstoff schwamm. Nach dem Einfrieren wurden die Gehirne sofort in eine Tiefkühltruhe überführt und dort bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.4.2 *In situ*-Hybridisierung

Mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierung kann die mRNA eines bestimmten Gens im Gewebe lokalisiert werden. Die Methode beruht auf der Reassoziationskinetik doppelsträngiger Nucleinsäuremoleküle. Für die Herstellung der RNA-Sonden wird ein Plasmid mit einem inklonierten Zielgen verwendet. Das Plasmid wird linearisiert und die anti-*sense*, bzw. *sense* Sonde über eine *in-vitro* Transkription hergestellt. Im Gewebe bindet anti-*sense* Sonde an die zu lokalisierende mRNA, während die *sense*-Sonde der Kontrolle unspezifischer RNA-RNA Bindungen dient. Gewebeschnitte werden mit den jeweiligen Sonden inkubiert, wobei es zur Hybridisierung und somit zur Bindung der anti-*sense* Sonde an die gewünschte mRNA kommt. Da die Sonde meist im Überschuss zugegeben wird, erfolgen im Anschluss einige Waschschrte, um die nicht gebundenen RNA-Stränge von den Schnitten zu entfernen. Die Sonden wurden in der vorliegenden Arbeit radioaktiv markiert und der Nachweis der *arg3.1*-mRNA erfolgte über Auflegen eines Röntgenfilms

auf die behandelten Schnitte. Details über die Sonden und die Versuchsdurchführung sind im Folgenden beschrieben.

Um einem Abbau der *arg3.1*-mRNA durch RNasen vorzubeugen, wurden alle verwendeten Glaswaren, Geräte und Arbeitsflächen vor der Benutzung entweder mind. 2h bei 180 °C gebacken, oder mit „RNase away“ (MolecularBioProducts) behandelt. Des weiteren wurden alle Lösungen bis zur Hybridisierung in DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser angesetzt. Für alle weiteren Lösungen wurde Millipore gefiltertes Wasser benutzt. Die Gehirne wurden mit einem Kryostaten horizontal geschnitten. Alternierende, 20 µm dicke Schnitte wurden direkt vom Schnittmesser auf Superfrostobjektträger (*in situ*- Hybridisierung), oder gelatinierte Objektträger (Nissl-Färbung; siehe 2.4.3.) aufgenommen. Auf jeden Objektträger wurden Schnitte 3 verschiedener Gehirne (2x Salicylat; 1 x Saline) übertragen. Die Schnitte für die *in situ*-Hybridisierung wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Insgesamt wurden 34 Objektträger behandelt, davon 16 (10x anti-*sense*; 6x *sense*) der Tiere CM 74, 75, 76 und 18 (10x anti-*sense*; 8 x *sense*) der Tiere CM 77, 78, 79. Das linearisierte Plasmid für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonden wurde mir freundlicherweise von Professor Dr. Kuhl (FU Berlin) zur Verfügung gestellt. Die Uridin 5'-[α³⁵S]thio]triphosphat-markierte *arg3.1*-anti-*sense* Sonde wurde vom SP6 Promotor des mit Sal I linearisierten Plasmids (pSPORT-1) transkribiert. Das einklonierte Segment betrug 3.1 kb der *arg3.1*-cDNA. Eine identisch lange Uridin 5'-[α³⁵S]thio]triphosphat-markierte *sense*-Sonde wurde vom T7 Promotor des mit Not I linearisierten Plasmids transkribiert (siehe auch Link et al., 1995).

Versuchsprotokoll:

Linearisierung des Plasmids (wurde von Mitarbeitern der AG Kuhl durchgeführt):

- für die Restriktion wurden 10 µg Plasmid eingesetzt.
 - x µl DNA
5 µl 10 x Puffer
5 µl Enzym (10U/µl); Sal I bzw. Not I
x µl H₂O
-
- Σ = 50 µl, 37 °C, über Nacht
- Auffüllen auf 100 µl mit H₂O

- + 100 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)
- 30 sec. vortexen, dann bei maximaler Spinzahl (spin max.) 1 min zentrifugieren
- Überstand + 100µl Phenol-Chloroform-Isoamylalcohol
- 30 sec. vortexen; spin max. 1 min
- Überstand + 1 Vol. Chloroform-Isoamylalcohol (24:1)
- 30 sec vortexen; spin max. 1 min
- Überstand
 - + 10 µl Natriumacetat 3 M, pH 5,2
 - + 5 µl 10 mg/ml Glykogen
 - + 250 µl 100% EtOH
- 5 min bei RT stehen lassen
- 5 min bei 12000 x g zentrifugieren
- Überstand absaugen
- Pellet waschen mit 70 % EtOH
- 5 min bei 12000 x g zentrifugieren
- Pellet kurz trocknen lassen und in TE-Puffer pH 8 aufnehmen
- Lagerung des linearisierten Plasmids bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung

Herstellung der Sonde durch *in vitro*-Transkription:

- Die *in vitro*-Transkription wurde nach dem Novagen *sure-site* Protokoll mit einem SP6/T7 RNA Polymerase Kombinationssystem von Promega (P1460) durchgeführt
- für die *sense*- bzw. *anti-sense* Sonde wurde jeweils 1 Transkriptionsmix hergestellt:

4 µl 5x Transkriptionspuffer
 2 µl 100 mM Dithiotreitol (DTT)
 je 1 µl 10 x NTP (ATP, GTP, CTP, je 10 mM)
 8 µl α[³⁵S] UTP 0,16 mCi (Hartmann Analytic)
 2 µl Polymerase (Sp6 für *anti-sense*; T7 für *sense*)

 Σ 20 µl , 1h, 37 °C

- Vorbereitung der Reinigungssäule („mini quick spin DNA columns“; Roche); 1,5 min bei 3000 x g zentrifugieren
- Reinigungssäule in neues Eppendorfgefäß mit
 - 10 µl 1 M DTT
 - 20 µl 3 M Na-Acetetat pH 5.2
 - 10 µl t-RNA (aus Hefe 10 mg/ml)
- Transkriptionsmix mit 100 mM DTT auf 100 µl auffüllen und auf die Reinigungssäule geben, 5 min bei 3000 x g zentrifugieren
- 2 Volumen 100 % EtOH zugeben und 10 sec auf Eis stellen
- 15 min spin max.
- EtOH abnehmen, 1 min bei maximaler Umdrehung zentrifugieren, restl. EtOH abnehmen und bei 37 °C für 20 min trocknen

- + 40 µl 1 M DTT, 20 min bei RT auf Schüttler
- + 400 µl Hybridisierungslösung
- 1 µl der Sonde im Szintillationszähler messen
(hier: *sense*-Sonde: 15.196,20 CPM (counts per minute); *anti-sense*-Sonde: 4.653,02 CPM)
- Ermitteln des Verdünnungsfaktors, über die Menge an eingebautem, radioaktiv markiertem Uracil. Für die vorliegende Arbeit wurde die Sonde 1:10 verdünnt:
 - 1 ml Hybridisierungslösung
 - + 10 µl 1 M DTT
 - + 100 µl Sonde
- fertigen Hybridisierungsmix bei 55 °C vorwärmen

Vorbereitung der Schnitte:

- Auftauen und Trocknen der Schnitte
- Fixierung in einer 4%igen Paraformaldehydlösung (PFA in 0,1M PBS, pH 7,4) für 15 min
- 3 x Waschen in PBS
- Acetylierung der Schnitte:
 - 3 min bei RT in Triethanolamin, pH 8
 - 10 min bei RT in Triethanolamin, pH 8 + 350 µl Essigsäureanhydrid
- Entwässern der Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe
- Schnitte trocknen lassen

Hybridisierung:

- pro Objektträger 100 µl Hybridisierungsmix zugeben
- Deckgläschen aufbringen und mit DPX (Fulka) abdichten
- Inkubation bei 55 °C für 18 h

Waschen der Schnitte:

- DPX von Deckgläschen entfernen
- 20 min in 4 x SSC (Salzpuffer) auf Schüttler
- Deckgläschen entfernen
- 2 x 10 min in 4x SSC auf Schüttler
- 30 min in RNase- Puffer bei 37 °C
- 15 min 2 x SSC bei RT
- 15 min 1 x SSC bei RT
- 15 min 0,5x SSC bei RT
- 30 min 0,1x SSC bei 55 °C
- 10 min 0,1x SSC bei RT
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe
- Schnitte trocknen und dann einen Röntgenfilm (Biomax MR) für 1-3 Tage auflegen
- Entwickeln des Röntgenfilms
- ggf. Röntgenfilm für einen längeren Zeitraum auflegen

Verwendete Lösungen :**Phosphatgepufferte Kochsalzlösung: PBS 0,1 M, pH 7,4**

Stammlösung 1M:

80g	NaCl	
2g	KCL	
14,4g	Na ₂ PO ₄	
2,4 g	KH ₂ PO ₄	ad 1 Liter H ₂ O bidest.

Für den Gebrauch wurde die Lösung 1:10 verdünnt

20 x SSC, pH 7,0

3 M	NaCl
0,3 M	Na- Citrat

Hybridisierungslösung

4x	SSC
50%	Formamid
1x	Denhardts-Reagenz
5%	Dextransulfat 0,5mg/ ml
0,5mg/ ml	ss DNA (Heringssperma)
0,25 mg/ml	Hefe t-RNA

Denhardts Reagenz 100x

2g	Ficoll (Type 400)
2g	Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)
2g	RSA (Fraction V)

ad 1 Liter H₂O bidest.

RNase -Puffer

5M	NaCl
1M	Tris (pH 8)
0,5M	EDTA (pH 8)

kurz vor Gebrauch 10 mg/ml RNase (Böhringer) zugeben

Bis auf den SSC-Puffer wurden alle Lösungen und Puffer in DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser angesetzt.

2.4.3 Nissl-Färbung

Wie unter 2.4.2. beschrieben, wurde jeder zweite Schnitt der Gehirne CM 74-76 und CM 77-79 auf gelatinierte Objektträger aufgezogen und für die Nissl-Färbung verwendet. Mit der Nissl-Färbung werden Ribonukleoproteine angefärbt und somit Bestandteile des Zellkerns und des endoplasmatischen Retikulums sichtbar gemacht. Das Prinzip der Färbung beruht auf einer Überfärbung eines alkoholfixierten Schnittes mit einem basischen Thiazinfarbstoff. Anschließend wird der Farbstoffüberschuss mit Alkohol ausgewaschen. Die Nissl-Substanz wird dabei intensiv blau oder violett, während Kernmembran, Nukleolen, Zytoplasma der Ganglienzellen und Gliazellen blassblau gefärbt werden und Zellfortsätze ungefärbt bleiben. Über die Morphologie und Dichte der Nervenzellen können Gehirngebiete definiert und gegeneinander abgegrenzt werden. In der vorliegenden Arbeit diente diese Färbung zur Bestimmung der Gehirngebiete in denen in benachbarten Schnitten *arg3.1*-mRNA detektiert wurde.

Versuchsprotokoll:

- Entfetten der Schnitte in 70% Ethanol für mindestens 2 h
- Spülen in H₂O dest. für 10 min
- 10 min in 0,1 M Natriumacetat-Puffer
- 20 min in Kresylviolett, 0,25% in 0,1 M Na-Acetat-Puffer, pH 4,6,
- Kurz schwenken in 0,1 M Natriumacetat-Puffer
- 2x ca. 3 min in 70% Ethanol, die Entfärbung sollte unter dem Mikroskop kontrolliert werden
- 2 x 5 min in 96% Ethanol
- 2 x 15 min in Isopropylalkohol
- 2 x 10 min in Xylol
- Eindeckeln der Schnitte mit Eukitt (O.Kindler)

2.4.4 Auswertung

Von den Gehirnen CM 74-76 wurden jeweils 14 Schnitte behandelt und ausgewertet. Zehn der Schnitte wurden so gewählt, dass die primären auditorischen Felder AI und AAF erfasst wurden. Von diesen Schnitten wurden jeweils 6 mit der *anti-sense* Probe und 4 mit der *sense*-Sonde behandelt. Vier Schnitte stammten aus dem Bereich der Amygdala (2x *anti-sense*; 2x *sense*). Von den Gehirnen 77-79 wurden je 18 Schnitte behandelt, 10 aus dem Bereich des AC (6x *anti-sense*; 4x *sense*) und 8 aus dem Bereich der Amygdala (4x *anti-sense*; 4x *sense*). Die Auswahl der Schnitte erfolgte nach den unter 2.2.4.1 genannten Kriterien. Alle Schnitte wurden qualitativ bewertet. Bereiche in denen *arg3.1*-mRNA vorlag, waren in den Röntgenfilmen besonders stark geschwärzt. Über die benachbarten Nissl-gefärbten Schnitte konnten die markierten Bereiche der Amygdala den verschiedenen Untereinheiten zugeordnet werden (siehe Abb. 3.16).

2.5 Versuchsreihe 4: Charakterisierung der Arg3.1-bildenden Neurone über Fluoreszenz-Doppelmarkierungen

2.5.1 Behandlung der Versuchstiere

Alle 11 Tiere dieser Versuchsreihe bekamen einmalig eine Natrium-Salicylatlösung in einer Konzentration von 350 mg/kg injiziert (Gruppe 10). Behandlung und Perfusion wurden wie unter 1.3.1 beschrieben durchgeführt.

2.5.2 Fluoreszenz-Doppelfärbung

Die Fluoreszenz-Doppelfärbungen dienten der näheren Bestimmung der Arg3.1-bildenden Neurone. Es wurden drei verschiedene Doppelfärbungen durchgeführt: Arg3.1/c-Fos, Arg3.1/GABA (γ -Aminobuttersäure) und Arg3.1/Nissl. Über die Arg3.1/c-Fos-Doppelfärbung wurde untersucht, ob Arg3.1 und c-Fos in denselben Neuronen gebildet werden. Da GABA der einzige bekannte inhibitorische Transmitter im Cortex ist, konnte über die Arg3.1/GABA Doppelfärbung untersucht werden, ob Arg3.1 in erregenden oder in hemmenden Neuronen des auditorischen Cortex gebildet wird. Außerdem sollte über eine Kombination aus Nissl-Fluoreszenzfärbung und Arg3.1-Immunreaktion überprüft

werden, ob Arg3.1 nur in neuronalen oder auch in Gliazellen gebildet wird und wie groß die Arg3.1-bildenden Neurone sind (siehe auch 2.4.3 und 2.5.3).

Von allen Gehirnen wurden mit einem Vibratom 40-50 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt. Die Behandlung der Schnitte erfolgte nach dem unten beschriebenen Protokoll. Für die Arg3.1/c-Fos und die Arg3.1/GABA-Doppelfärbungen wurden die Schnitte jeweils mit einem Cocktail aus primären bzw. sekundären Antikörpern (siehe Protokoll) behandelt. Für Arg3.1/Nissl wurde zunächst die Arg3.1-Fluoreszenzfärbung und anschließend die Fluoreszenz-Nisslfärbung durchgeführt.

Protokoll für Arg3.1/c-Fos- bzw. Arg3.1/GABA-Fluoreszenz-Doppelfärbung:

- 3x waschen in TRIS-T; je 10 min
- Inkubation mit einem Cocktail aus Primärantikörpern über Nacht bei RT
 - Arg3.1/c-Fos:* anti-Arg3.1; sc-6381 Lot# C292 (Santa Cruz); 1:20;
anti-c-Fos; sc-52 Lot# 188 (Santa Cruz); 1:80;
 - Arg3.1/GABA:* anti-Arg3.1; sc-6381 Lot# C292 (Santa Cruz); 1:20;
Anti-GABA; AB 2052 Lot# 101K4837 (Sigma)1:500
in TRIS-T-ENS
- 3x waschen in TRIS; je 10 min
- Inkubation mit einem Cocktail aus sekundären Antikörpern für 2 h bei RT
 - für anti-Arg3.1 aus Ziege: anti-Ziege gekoppelt an
Cy 3 (Dianova); 1:100
 - für anti-c-Fos aus Hase: anti-Hase gekoppelt an
Cy 2 (Dianova); 1:100
 - in TRIS-RSA
- 3x waschen in TRIS; je 10 min
- 1x waschen in H₂O dest.
- aufziehen, trocknen
- kurz in Methylsalicylat (Sigma) tauchen und eindeckeln mit Fluoromount (Serva)

Protokoll für Arg3.1/Nissl-Fluoreszenz-Doppelfärbung:

- 3x waschen in TRIS-T; je 10 min
- Inkubation mit anti-Arg3.1 (aus Ziege); sc-6381 Lot# C292 (Santa Cruz); 1:20 über Nacht bei RT
- 3x waschen in TRIS; je 10 min
- Inkubation mit anti-Ziege gekoppelt an Cy 3 (Dianova); 1:100 in TRIS für 2 h bei RT
- 2x waschen in TRIS, je 10 min
- 1x waschen; 10 min in KPBS
- 1x waschen; 10 min in KPBS –T
- 2x waschen ; 5 min in KPBS
- Inkubation mit Fluoreszenz-Nisslsubstanz (N-21480, Molecular Probes); 1:20 in KPBS für 1 h bei RT auf Schüttler
- einmal waschen; 10 min in KPBS-T
- 2x waschen 5 min in KPBS
- 2 h bei RT in KPBS oder über Nacht bei 4°C
- aufziehen, trocknen und eindeckeln mit Fluoromount (siehe oben)

Verwendete Lösungen:**Kaliumphosphatpuffer: KPBS 0,1 M pH 7,4**

Stammlösung 1M:

KCL	2g	
KH ₂ PO ₄	2g	
NaCl	80g	
Na ₂ HPO ₄	11,5g	ad 1L H ₂ O bidest.

Für den Gebrauch wurde die Lösung 1:10 verdünnt

KPBS-T: KPBS + 0,1% Triton

TRIS-Puffer: TRIS 0,05 M pH 7,4

Stammlösung 0,5M:

NaCl	116,9g	
TRIS	60,6g	ad 1L H ₂ O bidest.

Für den Gebrauch wurde die Lösung 1:10 verdünnt

TRIS-T: TRIS+ 0,3% Triton

TRIS-T-ENS: TRIS-T + 5 % Eselnormalsesum (ENS, Dianova)

TRIS- RSA: TRIS + 2 % Rinderserumalbumin

2.5.3 Auswertung

Für die Arg3.1/c-Fos-Doppelfärbung wurden insgesamt 81 Schnitte von 11 Tieren, für Arg3.1/GABA 41 Schnitte von 5 Tieren und für Arg3.1/Nissl 34 Schnitte von 7 Tieren ausgewertet (siehe auch Tab. 2.2). Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Aristoplan, Leitz) mit den entsprechenden zwei Filterblöcken. Für den Nachweis von Arg3.1 wurde der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Indocarbocyanin; Max. Anregung bei 552 nm; max. Emission bei 570 nm) und der Filter N.2.1 (513687, Leitz; Anregung 515-560 nm; Sperrfilter 580 LP), für c-Fos der Farbstoff Cy2 (Carbocyanin; max. Anregung bei 489 nm; max. Emission bei 505 nm) und der Filter I3 (Leitz 513687; Anregung 450-490 nm; Sperrfilter 515 LP) eingesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff für die Anfärbung der Nissl-Substanz hat laut Herstellerangaben (Molecular Probes) ein Anregungsmaximum bei 500 nm und eine maximal Emission bei 525 nm. Für die Detektion wurde ebenfalls der Filter I3 verwendet. Alle Schnitte wurden zunächst qualitativ bewertet. Bei allen Arg3.1-positiven Neuronen wurde durch Wechseln des Filters überprüft, ob diese auch positiv für c-Fos bzw. GABA waren. Die Nissl-gefärbten Schnitte dienten zur Überprüfung der Größe und der Lokalisation der Arg3.1-Neurone. Über eine Digitalkamera (Basler, Vision Technologies) wurde ein digitales Bild des jeweiligen Schnittbereichs aufgenommen und die Durchmesser der Arg3.1-Neurone mit Hilfe des Programms Lucia Image (MV-1500, Version 4.61) vermessen. Dabei wurde darauf geachtet, dass bei oval erscheinenden Neuronen immer die längere Distanz gemessen wurde.

Die in den Abbildungen 3.18 3.19, 3.20 und 3.21 präsentierten Bilder wurde mit Hilfe eines Konfokalmikroskops (CLSM; confocal laser scanning microscope; TCS SCP I, Leica Microsystems, Heidelberg) aufgenommen. Dabei wurde für alle Bilder ein 40x Öl-Immersions-Objektiv (HCX PLAN APO, N.A. 1.25) verwendet. Cy2 wurde mit der 488 nm Linie eines Ar-Lasers angeregt und bei 505-540 nm detektiert. Cy3 wurde mit der 543 nm Linie eines HeNe-Lasers angeregt. Da Cy2 noch bis ca. 570 nm detektiert werden kann wurde Cy3 bei 580-700 nm nachgewiesen. So konnte vermieden werden, dass bei der Cy3-Detektion auch Cy2 detektiert wurde. Alle Scans wurden 3x akkumuliert und die Bildstapel mit einem Abstand von 407 nm in der z-Achse aufgenommen. Die Öffnungsweite des *pinholes* betrug 1 Airy. Alle Bilder wurden mit der Leica Confocal Software (LCS, Leica Microsystems, Heidelberg) und dem Programm ImagJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) bearbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus Versuchsreihe 1: Immunhistochemischer Nachweis des Arg3.1- und c-Fos-Proteins nach akustischer Stimulation, Salicylat- und Salineinjektion

3.1.1 Allgemeine Beobachtungen

Die Markierung des Arg3.1-Proteins führte zu einer schwarz-violetten Färbung des Zellkerns, des Somas und der proximalen Dendriten (Pfeil in Abb. 3.1). In manchen Schnitten konnte auch eine Färbung der apikalen Dendriten beobachtet werden, jedoch zeigten sich in der Dendritenfärbung keine deutlichen Muster oder Gruppenunterschiede. Die Arg3.1-Proteinbildung war, mit Ausnahme von einem Tier (siehe 3.1.2), auf das Vorderhirn beschränkt. Neben dem auditorischen und dem limbischen System wurden Arg3.1-bildende Neurone, kurz Arg3.1-Neurone, auch im Striatum und im Parietalcortex gefunden.

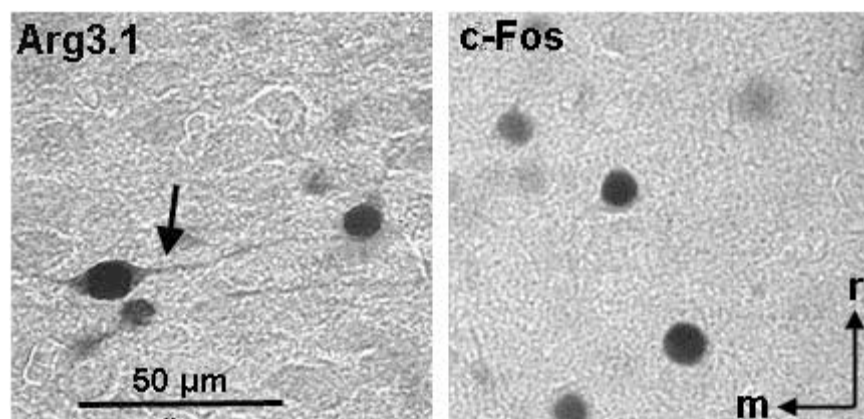


Abb. 3.1 Beispiel für den Nachweis des Arg3.1- und c-Fos-Proteins

Arg3.1- (linkes Bild) und c-Fos-Neurone (rechtes Bild) im rechten auditorischen Cortex der Wüstenrennmaus. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops und einer digitalen Kamera aufgenommen. Beide Proteine wurden mittels eines klassischen immunhistochemischen Verfahrens mit DAB als Chromogen nachgewiesen. Es zeigt sich, dass Arg3.1 im Soma und in den proximalen Dendriten lokalisiert ist (Pfeil), während c-Fos nur im Zellkern vorliegt. Der Maßstab gilt für beide Aufnahmen. m - medial, r - rostral

Die Markierung des c-Fos-Proteins führte zu einer Anfärbung des Zellkerns. Gefärbte Neurone hatten eine ovale Form und waren im ganzen Gehirn zu finden. Die Verteilung der c-Fos bildenden Neurone, kurz c-Fos-Neurone, entsprach den Ergebnissen aus früheren Studien (Wallhäusser-Franke et al., 2003; siehe auch 1.4). Dementsprechend wurden c-Fos-Neurone neben dem auditorischen Cortex (AC) und dem limbischen System auch in den intralaminären thalamischen Kernen, im präfrontalen Cortex, im Striatum, im Locus coeruleus und in verschiedenen Hypothalamus- und Hirnstammregionen gefunden. Das Weglassen der Primärantikörper und die Vorinkubation des anti-Arg3.1-Primärantikörpers mit dem entsprechenden Blockingpeptid verhinderten die Färbung.

3.1.2 Lokalisation des Arg3.1-Proteins im auditorischen System

Mit Ausnahme von wenigen Arg3.1-Neurone im Colliculus inferior (IC) eines Tieres, konnten keine Arg3.1-Neurone in subcorticalen auditorischen Gebieten gefunden werden. Dieses Tier war mit einem schmalbandigen Rauschen zentriert um 8 kHz (NBW-8 kHz) stimuliert worden. Die Anzahl an c-Fos-Neuronen im IC dieses Tieres war ungefähr doppelt so hoch, wie die Anzahl in den ICs der anderen akustisch stimulierten Tiere. Der mediale Kniekörper (MGB) wurde hier wegen der begrenzten Schnitzzahl (siehe 2.2.4) nicht systematisch untersucht. In den vorhandenen Schnitten konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen entdeckt werden.

Auditorischer Cortex: Die Anzahl und Verteilung der Arg3.1-bildenden Neurone wurde in den zwei primären auditorischen Feldern AI und AAF des auditorischen Cortex (AC) untersucht. In der Wüstenrennmaus sind diese beiden Felder tonotop organisiert und besitzen eine gemeinsame hochfrequente Grenze. Neurone, die am besten auf niedrige Frequenzen antworten, findet man caudal in AI und rostral in AAF, während Neurone, die am besten auf hohe Frequenzen antworten, rostral in AI und caudal in AAF lokalisiert sind (siehe auch 1.1.2). Wenn man in den dorsalen und mittleren Teilen von AI im Horizontalschnitt eine vertikale Linie durch die rostralen Pole der Hippocampi beider Hemisphären zieht, stimmt diese Linie ungefähr mit der 1 kHz Isofrequenz-Bande in AI überein (Scheich et al., 1993; Budinger et al., 2000a). Diese Linie wird im Folgenden auch als Hippocampus-Referenzlinie (HRL) bezeichnet (siehe auch 2.2.3.1). In Abbildung 3.2 sind Bilder repräsentativer Schnitte aus den Gruppen 1, 2, 3 und 5 dargestellt. Die meisten

Arg3.1-Neurone wurden im AC nach Stimulation mit einem schmalbandigen Rauschen (NBW; Gruppe1) und nach Salicylatinjektion (Gruppe 2+4) gefunden. Nach Salineinjektionen unterschied sich die Anzahl an Arg3.1-Neuronen zwischen den Gruppen 3 und 5. Alle Tiere der Gruppe 3, die lauten Hintergrundgeräuschen ausgesetzt waren, zeigten schwach gefärbte Neurone im AC. Im Gegensatz dazu fanden sich keine Arg3.1-Neurone im AC von Tieren, die diesen unkontrollierten Störgeräuschen nicht ausgesetzt waren (Gruppe 5).

Da die Arg3.1-Neurone nach akustischer Stimulation und Salicylatinjektion lokale Maxima zeigten, wurde die Verteilung der Neurone genauer untersucht. Es wurden Computerzeichnungen von je sechs Horizontalschnitten übereinander projiziert und die Anzahl der Neurone gegen die rostro-caudale Ausdehnung aufgetragen (2.2.4.2). Beispiele für die so gewonnenen Bilder und Graphen sind in Abbildung 3.3 gezeigt. Es zeigte sich, dass die akustische Stimulation mit NBW zentriert um 1 kHz (NBW-1 kHz) und 8 kHz (NBW-8 kHz) in vier von sechs Tieren zu einer intensiven Arg3.1-Markierung in den Feldern AI und AAF führte. Wie in Abbildung 3.3 dargestellt, waren die markierten Neurone über alle corticalen Schichten verteilt, zeigten jedoch nach NBW-8 kHz eine lokale Häufung in Schicht IV. Um einen Überblick über die Lage der lokalen Maxima in rostro-caudaler Ausdehnung zu erhalten, wurden alle ermittelten Maxima in Beziehung zur HRL aufgetragen. Abbildung 3.4 zeigt die Lage der lokalen Maxima. NBW-1 kHz führte in jeder Hemisphäre zu zwei deutlichen Maxima, eines lokalisiert in AI und eines in AAF. Der Abstand zwischen den Maxima einer Hemisphäre variierte zwischen 1,9 und 2,2 mm. Dies steht in Einklang mit den von Scheich et al. (1993) und Thomas et al. (1993) beschriebenen tonotopen Gradienten in AI und AAF, die einen entsprechenden Abstand zwischen den 1 kHz Isofrequenz-Linien beschrieben haben. Zwischen den Hemisphären variierten die Maxima nach Stimulation mit NBW-1 kHz bis zu 0,8 mm in rostro-caudaler Ausbreitung. In einem der Tiere waren die Maxima in der linken, in einem anderen in der rechten Hemisphäre weiter caudal lokalisiert (Abb. 3.4). Nach NBW-8 kHz wurden mehr Arg3.1-Neurone gefunden, als nach NBW-1 kHz. Die Positionen der Maxima waren hier nur 1,3 bis 1,7 mm weit auseinander und variierten zwischen den Hemisphären um bis zu 0,7 mm in rostro-caudaler Ausdehnung. Nach Stimulation mit NBW-8 kHz lagen die Maxima beider Tiere in der linken Hemisphäre weiter caudal. In zwei Tieren dieser Gruppe (1x NBW-1 kHz, 1x NBW-8 kHz) wurden nur sehr wenige Arg3.1-Neurone gefunden und es konnten daher keine Orte maximaler Immunoreaktivität bestimmt werden. In diesen Tieren war auch die Anzahl an c-Fos-Neuronen geringer (siehe 3.1.3).

Fünf Stunden nach einer Salicylatinjektion kam es zu einer deutlichen Markierung der Arg3.1-Neurone im AC. In Abbildung 3.3 ist ein repräsentativer Fall für ein Salicylat behandeltes Tier der Gruppe 2 dargestellt. Die markierten Neurone waren über alle Schichten verteilt und häuften sich an bestimmten Orten entlang der rostro-caudalen Ausdehnung, d.h. entlang des tonotopen Gradienten. Im Gegensatz zu den mit NBW-8 kHz stimulierten Tieren gab es hier keine Häufung der Neurone in Schicht IV des AC. Arg3.1-Neurone in sechs Gehirnen der Tiere aus Gruppe 2 wurden ausgezählt, während Arg3.1-Neurone in Tieren der Gruppe 4 nur qualitativ bewertet wurden. Sieben von insgesamt neun Tieren (4x Gruppe 2; 3x Gruppe 4) zeigten ein lokales Maximum an Arg3.1-Neuronen im hochfrequenten Bereich des AC. In Tieren der Gruppe 2 wurden die meisten Neurone an der Grenze zwischen AI und AAF gefunden (Abb. 3.3 und 3.4). In einem dieser Tiere schienen die hochfrequenten Maxima beider Hemisphären in AAF zu liegen, während in drei weiteren das Maximum in der linken Hemisphäre in AAF, das in der rechten aber in AI oder direkt auf der Grenze zwischen AI und AAF lag (Abb. 3.4). Zwei Tiere zeigten eine zusätzliche unilaterale Markierung in tieffrequenten Bereichen der rechten Hemisphäre. In einem Tier lag dieses Maximum in der Nähe der HRL, in dem anderen an der caudalen Grenze von AI. Ein anderes Tier der Gruppe 2 zeigte kein Maximum an der Grenze zwischen AI und AAF, sondern ein bilaterales Maximum in der Nähe der HRL und ein zusätzliches unilaterales Maximum rostral in AAF der rechten Hemisphäre. In Salicylat behandelten Tieren der Gruppe 4 schienen die Maxima im hochfrequenten Bereich etwas weiter caudal und damit in AI zu liegen. Ein Tier dieser Gruppe zeigte drei bilaterale Maxima in AI, eines im hochfrequenten Bereich, eines in der Nähe der HRL und eines caudal im tieffrequenten Bereich von AI. Ein Tier der Gruppe 2 zeigte eine stark abweichende Verteilung der Arg3.1-Neurone. Während die Anzahl an Neuronen im AC so niedrig war, dass man keine lokalen Anhäufungen bestimmen konnte, wurden sehr viele Arg3.1-Neurone rostral zu AAF im Parietalcortex gefunden (nicht gezeigt).

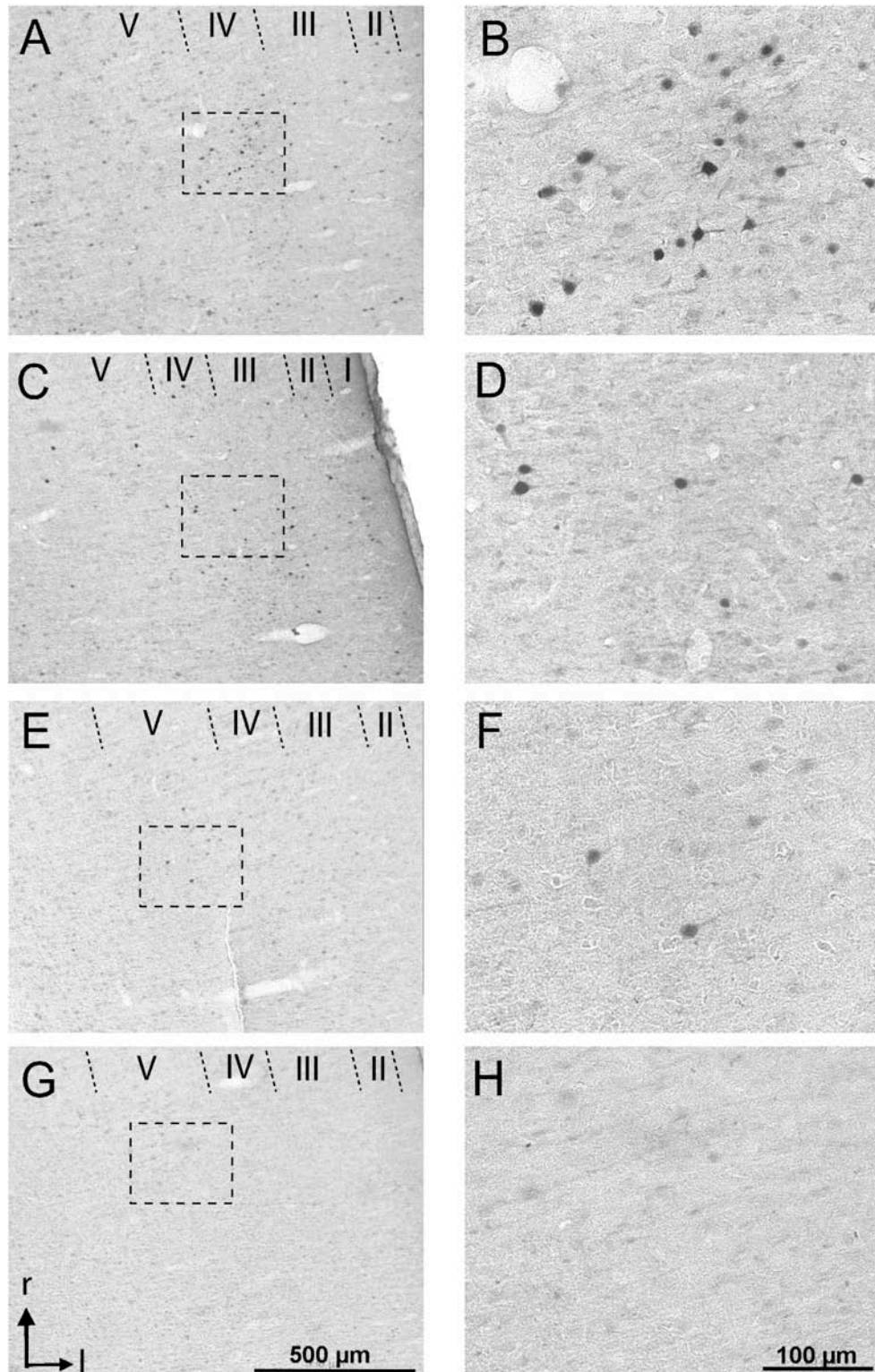


Abb. 3.2 Arg3.1-Neurone im hochfrequenten Bereich des AC

In A,C,E,G eingerahmte Bereiche sind in B,D,F,H vergrößert dargestellt. A+B: Nach akustischer Stimulation mit NBW-8 kHz (Gruppe 1) wurden Arg3.1-Neurone vermehrt in Schicht IV des AC gefunden. C+D: Salicylatinjektionen (Gruppe 2+4) führten zu einer vermehrten Arg3.1-Bildung im hochfrequenten Bereich des AC. Lokale Anhäufungen in Schicht IV wurden in diesen Tieren nicht beobachtet. E+F: Nach Salineinjektionen gepaart mit lauten Umgebungsgeräuschen (Gruppe 3) kam es zu einer schwachen Markierung des Arg3.1-Proteins in einigen Neuronen des AC. G+H: In leiser akustischer Umgebung (Tierstall) führten Salineinjektionen nicht zur Bildung des Arg3.1-Proteins (Gruppe 5).

Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung (Saline) führten zu einer Arg3.1 Markierung in AI und AAF in Tieren der Gruppe 3, während in Tieren der Gruppe 5 keine Arg3.1-Neurone gefunden wurden. Allerdings zeigten auch Tiere der Gruppe 3 keine deutlichen Muster in der Immunoreaktivität, weshalb auch keine lokalen Maxima bestimmt wurden. Verglichen mit den akustisch stimulierten und salicylatbehandelten Tieren waren die Arg3.1 markierten Neurone nur sehr schwach gefärbt (Abb. 3.2). In drei der sechs salinebehandelten Tieren der Gruppe 3 konnte eine leichte Erhöhung der Arg3.1-Neurone in Schicht IV beobachtet werden, während in den anderen drei Gehirnen dieser Gruppe keine spezifische Verteilung der Neurone gefunden wurde.

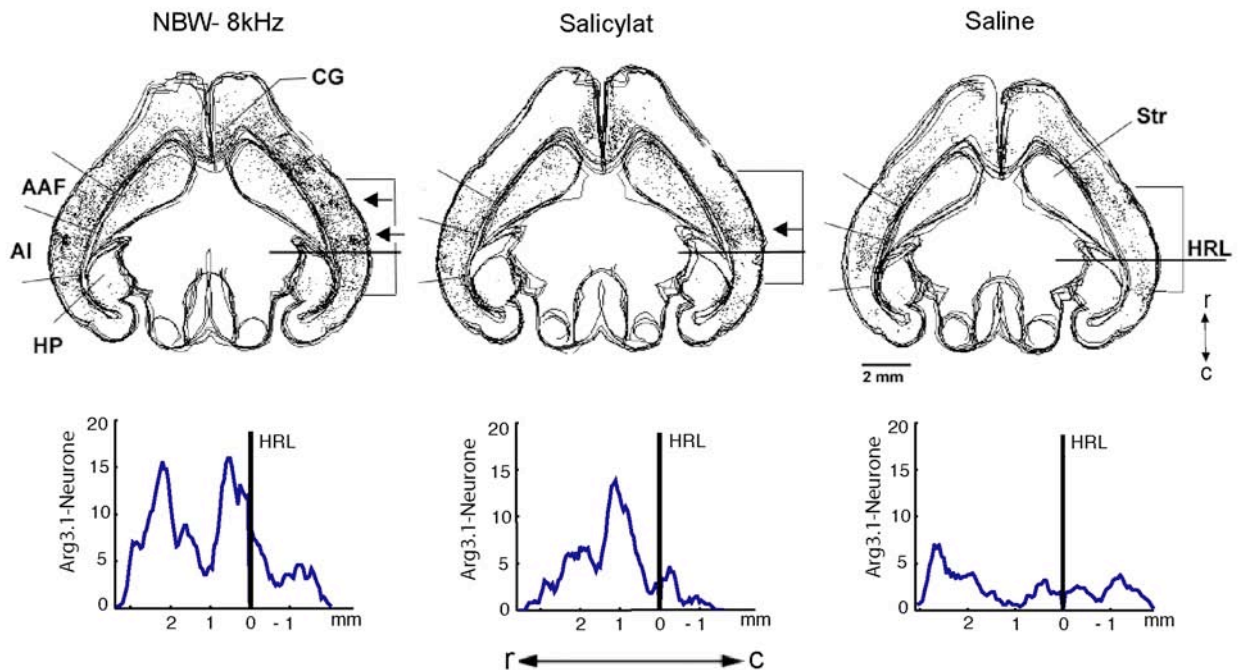


Abb. 3.3 Verteilung der Arg3.1-Neurone im AC

Gezeigt ist je ein Beispiel für ein akustisch stimuliertes (NBW- 8 kHz; Gruppe 1), ein salicylat- (Gruppe 2) und ein salinebehandeltes Tier (Gruppe 3). Für die oberen Bildern wurden je 6 Computerzeichnungen übereinander projiziert. Jeder schwarze Punkt entspricht einem Arg3.1-Neuron. Nach akustischer Stimulation und Salicylatinjektion kam es zu lokalen Anhäufungen der Arg3.1-Neurone in rostro-caudaler Ausdehnung (Pfeile). Um den Abstand dieser Maxima in Relation zur Hippocampus-Referenzlinie (HRL) zu bestimmen, wurde die Anzahl der Neurone im AC von lateral nach medial gezählt und im Abstand zur HRL aufgetragen. Die HRL entspricht im mittleren und dorsalen Bereich des AC der 1 kHz Isofrequenz-Bande (Scheich et al. 1993). Für die Konstruktion der HRL wurden die rostralen Pole der Hippocampi beider Hemisphären verbunden und diese Linie über den Cortex hinaus verlängert. Die unten dargestellten Graphen zeigen beispielhaft die Verteilung der Arg3.1-Neurone in Relation zur HRL in der jeweiligen rechten Hemisphäre der darüber dargestellten Computerzeichnungen. Die rostro-caudalen Grenzen der Zählung sind durch Klammern angezeigt. 0 auf der x-Achse in den Graphen entspricht der HRL. Es zeigt sich, dass es nach Stimulation mit NBW-8 kHz zu deutlichen Anhäufungen im AC kommt, wobei ein Maximum jeweils in AI, das andere in AAF lokalisiert war (Pfeile). Zusätzlich fanden sich Arg3.1-Neurone rostral zu AAF im Parietalcortex. Salicylatinjektionen führten zu einer maximalen Immunoreaktivität an der Grenze zwischen AI und AAF und damit im hochfrequenten Bereich des AC (Pfeil). Für Arg3.1-Neurone, die nach Salineinjektionen in Tieren gefunden wurden, die lauten Umgebungsgläuschen ausgesetzt waren (Gruppe 3), konnte keine einheitliche Verteilung festgestellt werden. In CG lagen nach allen Behandlungen Arg3.1-Neurone vor, wobei die Anzahl der markierten Neurone nach Salicylatinjektion und NBW-8 kHz höher war als nach Salinebehandlung. AAF - anteriores auditorisches Feld, AC - auditorischer Cortex, AI - primäres auditorisches Feld, c - caudal, CG - Gyrus cinguli, HP - Hippocampus, HRL - Hippocampus-Referenzlinie, r - rostral, Str - Striatum

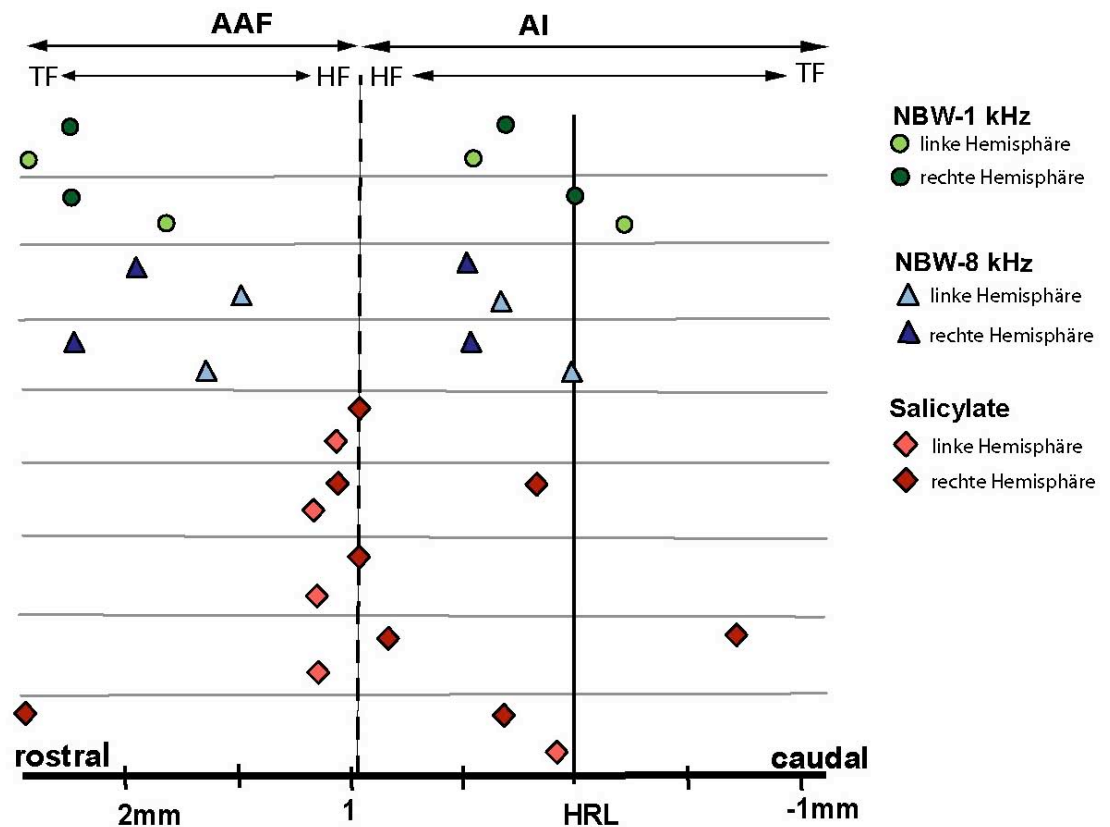


Abb. 3.4 Maximale Arg3.1-Immunoreaktivität in Relation zur HRL

Gezeigt sind die lokalen Maxima der Arg3.1-Neurone für vier akustisch stimulierte (Gruppe 1; Kreise und Dreiecke) und fünf salicylatbehandelte Tiere (Gruppe 2; Rauten). Für die Bestimmung der Maxima im AC wurden die Neurone in den Horizontalschnitten von lateral nach medial gezählt und gegen die rostro-caudale Ausdehnung aufgetragen (siehe auch Abb. 3.3). Alle so gewonnenen Maxima sind hier im Abstand zur HRL (vertikale Linie) aufgetragen. Maxima zwischen zwei horizontalen Linien entstammen immer einem Tier; dunklere Symbole repräsentieren die rechte, hellere die linke Hemisphäre. Die gestrichelte vertikale Linie deutet die Grenze von AI und AAF an. Nach akustischer Stimulation (NBW-1 kHz und NBW-8 kHz) wurden jeweils zwei Maxima pro Hemisphäre gefunden, eines in AI und eines in AAF. Obwohl die Lage dieser Maxima zwischen den Hemisphären variierte, blieb ihr Abstand zwischen den Maxima in einer Hemisphäre annähernd konstant. Der Abstand zwischen den Maxima war nach Stimulation mit NBW-1 kHz generell größer (1,9-2,2 mm; Kreise), als nach Stimulation mit NBW-8 kHz (1,3-1,7 mm; Dreiecke). Salicylatinjektionen führten zu lokalen Maxima (Rauten), die am häufigsten im hochfrequenten Bereich an der Grenze zwischen AI und AAF gefunden wurden. In manchen Tieren gab es zusätzliche Maxima caudal in AI und rostral in AAF. AI - primäres auditorisches Feld; AAF - anteriores auditorisches Feld; HF - hochfrequent; TF - tiefrequent

3.1.3 Lokalisation des c-Fos-Proteins im auditorischen System

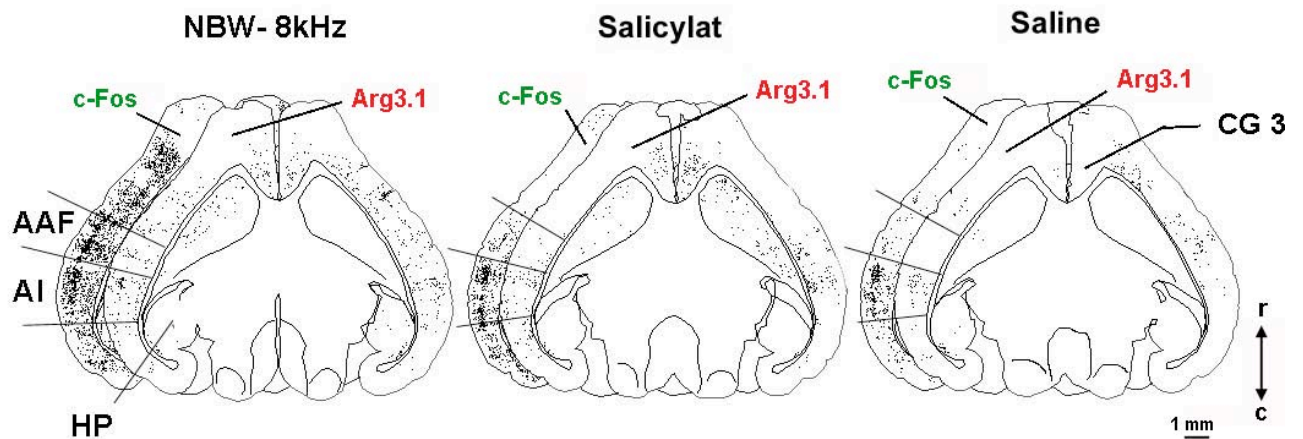


Abb. 3.5 Vergleich der Arg3.1- und c-Fos-Neurone im AC

Dargestellt sind Computerzeichnungen aufeinander folgender Horizontalschnitte für typische Fälle eines akustisch stimulierten (Gruppe 1; NBW-8 kHz), eines mit Salicylat (Gruppe 2) und eines mit Saline behandelten Tieres (Gruppe 3). Jeder schwarze Punkt entspricht einem markierten Neuron. Alle Behandlungen führten zu einer wesentlich höheren Anzahl und einer breiteren Verteilung der c-Fos-Neurone, verglichen mit der Anzahl und der Verteilung der Arg3.1-Neurone. Nach NBW-8 kHz und Salinebehandlung schienen die Arg3.1 und c-Fos-Neurone vermehrt in Schicht III und IV vorzuliegen. Im Gegensatz dazu wurde nach Salicylatinjektion nur c-Fos vermehrt in Schicht IV gefunden, während Arg3.1-Neurone gleichmäßig über alle Schichten verteilt vorlagen. AI - primäres auditorisches Feld, AAF - anteriores auditorisches Feld, c - caudal, CG – Gyrus cinguli, HP - Hippocampus; r - rostral

Auditorischer Cortex: C-Fos-Neurone waren immer zahlreicher und zeigten eine breitere Verteilung als Arg3.1-Neurone (Abb.3.5). Unabhängig von der Stimulationsfrequenz (Gruppe 1) waren c-Fos-Neurone über einen weiten Bereich von AI und AAF verteilt und zeigten keine deutliche Maxima in den zugehörigen tonotopen Frequenzbereichen. Allerdings wurde eine erhöhte Anzahl an c-Fos-Neuronen in den Schichten III und IV des AC gefunden. In den Gehirnen von zwei Tieren, in denen nach der akustischen Stimulation kaum Arg3.1-Neurone vorhanden waren, wurden nur wenige c-Fos-Neurone gefunden. Diese waren im Gegensatz zu den anderen Tieren aus Gruppe 1 hauptsächlich in Bereichen lokalisiert, die den Frequenzgehalt des Stimulus repräsentieren. Die Salicylatinjektionen (Gruppe 2+4) führten ebenfalls zu einer breit verteilten c-Fos-Expression in AI und AAF. Auch hier waren insgesamt viel mehr c-Fos-Neurone als Arg3.1-Neurone vorhanden und die Anzahl der c-Fos-Neurone war in den Schichten III und IV des AC erhöht. Nach Salineinjektionen kam es in den Gruppen 3 und 5 zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Während die Anzahl an c-Fos-Neuronen in den Tieren der Gruppe 3, die einem erhöhten Umgebungsgeräuschpegel ausgesetzt waren, sehr hoch war, ein Maximum in den Schichten III und IV zeigten und über einen weiten Bereich von AI und AAF verteilt vorlagen, konnten in den Tieren der Gruppe 5 (geringe Umgebungsgeräusche) nur wenig c-Fos-Neurone gefunden werden. In Gehirnen von sechs Tieren (3x Gruppe 1, 3x Gruppe 2) waren Arg3.1-Neurone deutlich in Bereichen lokalisiert, in denen in benachbarten Schnitten besonders viele c-Fos-Neurone gefunden wurden.

Colliculus inferior: NBW-1 kHz und NBW-8 kHz (Gruppe 1) führte zu einer vermehrten c-Fos-Bildung in den medialen und zentralen Bereichen des Colliculus inferior (IC), während c-Fos-Neurone nach Salicylatinjektionen (Gruppe 2) in eher peripheren Bereichen gefunden wurden (Abb.3.6). Auch im IC ist die Tonotopie am besten in Transversalschnitten zu sehen, somit konnten die markierten Neurone im IC nicht verlässlich bestimmten Frequenzbereichen zugeordnet werden. Dennoch schienen c-Fos-Neurone nach NBW Stimulation in dorso-ventraler Ausbreitung von medial nach lateral zu wandern, eine Verteilung die mit den Isofrequenz-Banden im IC in Einklang steht (Ehret und Fischer, 1991; Friauf, 1992; Adams, 1995). Interessanterweise war die Anzahl an c-Fos-Neuronen im IC der Tiere aus Gruppe 1, bei denen nach akustischer Stimulation keine Arg3.1-Neurone im AC gefunden wurden, vergleichbar mit der Menge an c-Fos-Neuronen im IC der anderen Tiere aus Gruppe 1. In Tieren der Gruppe 3 (Salineinjektion+ laute Umgebungsgeräusche) variierte die Verteilung der c-Fos-Neuronen stark zwischen den Individuen. Dabei zeigten Tiere mit vielen c-Fos-Neuronen in Schicht III und IV des AC im IC eine Verteilung der Neurone, die vergleichbar war mit der akustisch stimulierten Tiere. Hier wurden die meisten c-Fos-Neurone in den medialen und zentralen Bereichen des IC gefunden (Abb. 3.6).

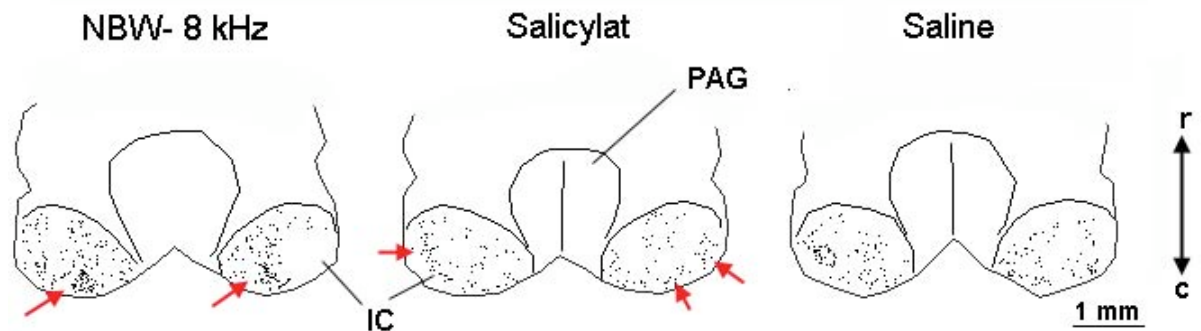


Abb. 3.6 Verteilung der c-Fos-Neurone im IC

Dargestellt sind Computerzeichnungen repräsentativer Horizontalschnitte eines akustisch stimulierten (Gruppe 1; NBW-8 kHz), eines mit Salicylat (Gruppe 2) und eines mit Saline behandelten Tieres (Gruppe 3). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein c-Fos-Neuron. Nach NBW-8 kHz wurden deutliche Anhäufungen von c-Fos-Neuronen in zentralen Bereichen des IC gefunden, während c-Fos-Neurone nach Salicylatinjektion eher in peripheren Bereichen des IC lokalisiert waren. Nach Salineinjektionen variierte die Verteilung der c-Fos-Neurone stark zwischen den Individuen. IC - Colliculus inferior, PAG - periaqueductales Grau

Nucleus cochlearis: C-Fos bildende Neurone wurden im ventralen Nucleus cochlearis (VCN) nach akustischer Stimulation und in salinebehandelten Tieren der Gruppe 3 gefunden. Keine c-Fos-Neurone wurden nach Salicylatinjektionen (Gruppe 2+4) und nach Salineinjektionen der Gruppe 5 gefunden. Der Unterschied in der c-Fos-Bildung nach Salinebehandlung (Gruppe 3+5) wurde auf die unterschiedlich hohen Umgebungsgeräusche während der Versuche zurückgeführt (siehe 2.2.1 und 3.1.2). Fast alle c-Fos-Neurone, die nach spezifischer (Gruppe 1) und unspezifischer akustischer Stimulation (Gruppe 3) gefunden wurden, befanden sich im posterioren Teil des VCN (PVCN). Im VCN gibt es eine tonotope Anordnung der Frequenzen mit einem Gradienten von hohen zu tiefen Frequenzen in dorso-ventraler Ausdehnung, welche am besten in Transversalschnitten zu sehen ist. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Horizontalschnitte verwendet, da die Tonotopie im AC in dieser Schnittrichtung am besten zu sehen ist. Die markierten Neurone im PVCN konnten somit in der vorliegenden Arbeit keinen bestimmten Frequenzbereichen zugeordnet werden. Der DCN konnte wegen der reduzierten Schnittzahl, die durch die gleichzeitige Behandlung des Gewebes von jeweils neun Tieren zustande kam, nicht systematisch untersucht werden. In den wenigen vorhandenen Schnitten zeigten sich jedoch keine c-Fos-Neurone im DCN.

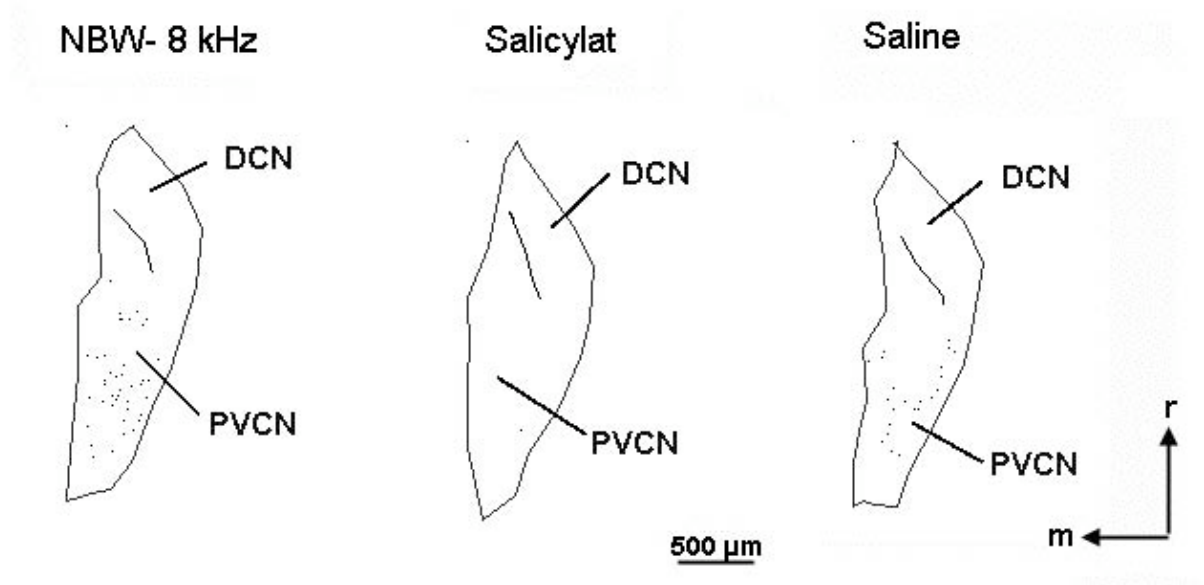


Abb. 3.7 Verteilung der c-Fos-Neurone im CN

Dargestellt sind Computerzeichnungen repräsentativer Horizontalschnitte eines akustisch stimulierten (Gruppe 1; NBW- 8 kHz), eines mit Salicylat behandelten (Gruppe 2) und eines mit Saline behandelten Tieres (Gruppe 3). Jeder schwarze Punkt entspricht einem c-Fos-Neurone. Nur die akustischen Stimulationen (spezifisch - Gruppe 1; unspezifisch - Gruppe 3) führten zur Bildung des c-Fos-Proteins im posterioren Teil des CN (PVCN). Im PVCN von salicylatbehandelten Tieren wurden dagegen kaum c-Fos-Neurone nachgewiesen. m - medial, r - rostral

3.1.4 Lokalisation des Arg3.1-Proteins im limbischen System

Unabhängig von der Behandlung zeigten alle Tiere Arg3.1-Neurone in verschiedenen Teilen des limbischen Systems, wie im Subiculum und Gyrus dentatus des Hippocampus, im Nucleus Accumbens und im perirhinalen und entorhinalen Cortex. Die Neurone waren in salinebehandelten Tieren weniger stark gefärbt, als in salicylatbehandelten oder akustisch stimulierten Tieren.

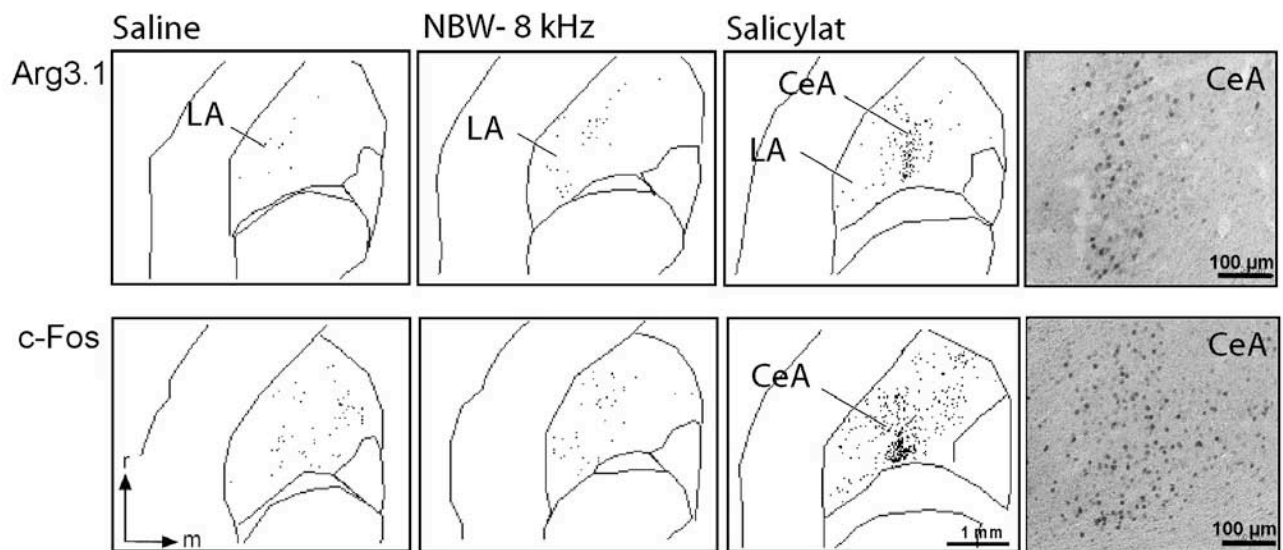


Abb. 3.8 Verteilung der Arg3.1- und c-Fos-Neurone in der Amygdala

Dargestellt sind Computerzeichnungen charakteristischer Horizontalschnitte eines akustisch stimulierten (Gruppe 1; NBW- 8 kHz), eines mit Salicylat (Gruppe 2) und eines mit Saline behandelten Tieres (Gruppe 3). Die gezeigten Schnitte für Arg3.1 (obere Reihe) und c-Fos (untere Reihe) entstammen jeweils dem gleichen Tier. Es zeigt sich, dass nur nach Salicylatinjektion im zentralen Teil der Amygdala (CeA) Arg3.1 und c-Fos-Neurone vorhanden waren. Dabei war die Anzahl der c-Fos-Neurone immer höher als die der Arg3.1-Neurone. Zudem wurden Arg3.1-Neurone vornehmlich in der lateralen Untereinheit von CeA gefunden. Die Fotografien rechts außen wurden mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops aufgenommen und zeigen eine Ausschnittsvergrößerung der Arg3.1 und c-Fos bildenden Neurone in CeA des salicylatbehandelten Tieres. In der lateralen Amygdala (LA) waren nach allen Behandlungen Arg3.1 und c-Fos-Neurone vorhanden, die Anzahl war jedoch in den mit Salicylat behandelten Tieren am höchsten. m- medial, r - rostral

Amygdala: Die Bildung des Arg3.1-Proteins wurde in der medialen (MeA), zentralen (CeA) und lateralen (LA) Amygdala untersucht. Diese Teile der Amygdala bestehen aus weiteren Untereinheiten, die in der vorliegenden Studie nicht getrennt betrachtet wurden. Die einzige Ausnahme bildet die laterale Untereinheit der zentralen Amygdala (CeL), die in dorsalen Schnitten der Amygdala gut zu erkennen ist und sich medial an den

interkalierenden Nucleus anschließt (siehe auch Abb. 2.4). Der laterale und anteriore Teil der basolateralen Amygdala wurden als laterale Amygdala zusammengefasst. In Abb. 3.8 sind repräsentative Schnitte im Bereich der Amygdala für alle Behandlungen dargestellt. Nach akustischer Stimulation (Gruppe 1) wurde eine deutliche Arg3.1-Markierung in LA gefunden, während die Anzahl an Arg3.1-Neuronen in CeA vernachlässigbar gering war. In den zwei Tieren, die nach akustischer Stimulation keine Arg3.1-Neurone in AC zeigten, war die Anzahl an Arg3.1-Neuronen in LA ca. 2-5 mal geringer als in den anderen Tieren dieser Gruppe (siehe auch Tab. 3.1). Salicylatinjektionen (Gruppe 2+4) führten zu einer starken Arg3.1-Bildung in LA und CeA. In CeA wurden die markierten Neurone hauptsächlich in CeL gefunden. Salineinjektionen führten zur Arg3.1-Bildung in LA in Tieren der Gruppe 3, die Anzahl war jedoch geringer als in den akustisch stimulierten Tieren der Gruppe 1 (Tab. 3.1). In Tieren der Gruppe 5 wurden dagegen nur sehr wenige Arg3.1-Neurone in LA gefunden. Die Anzahl der Arg3.1-Neurone war vernachlässigbar in CeA aller mit Saline behandelten Tieren. In MeA waren nach keiner der Behandlungen Arg3.1-Neurone vorhanden (siehe auch Abb. 3.11).

Gyrus cinguli: Im Gyrus cinguli (CG) wurden in allen untersuchten Tieren Arg3.1-Neurone gefunden. Nach Budinger und Scheich (2003) zeigen die Gebiete CG 1-3 eine Laminierung der Neurone, die von CG 2 über CG 3 bis CG 1 immer deutlicher wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gebiete CG 2 und 3 untersucht. Markierte Neurone wurden unabhängig von der Behandlungsgruppe in allen Schichten gefunden (Abb. 3.3). Dabei erschien die Anzahl der Neurone in solchen Gehirnen zahlreicher, in denen sie auch im AC häufiger vorkamen (Tab. 3.1). In drei der salicylatbehandelten Tiere wurden mehr Neurone in der rechten Hemisphäre gefunden, in den anderen drei Tieren war die Anzahl in beiden Hemisphären vergleichbar.

3.1.5 Lokalisation des c-Fos-Proteins im limbischen System

Die c-Fos-Bildung im limbischen System nach Salicylatinjektion wurde bereits in früheren Studien im Detail beschrieben (Wallhäusser-Franke et al., 2003). C-Fos bildende Neurone wurden nach Salicylatinjektion nicht nur in der Amygdala und im CG, sondern auch in verschiedenen anderen limbischen Gebieten gefunden. Auch in den vorliegenden Experimenten kam es zur c-Fos-Bildung im insulären, perirhinalen, entorhinalen und piriformen Cortex, im Bed nucleus oder interkalierten Nucleus der Stria terminalis, im Nucleus accumbens, im lateralen Septum und im Hippocampus und dort vor allem im Gyrus dentatus und Subiculum. Auch in den anderen Behandlungsgruppen (Saline und akustische Stimulation) wurden in diesen limbischen Gebieten c-Fos-Neurone gefunden, sie schienen jedoch schwächer markiert und wurden in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail untersucht.

Amygdala: In Gehirnen der akustisch stimulierten (Gruppe 1) und salinebehandelten Tiere (Gruppe 3+5) wurde immer eine erhöhte Anzahl an c-Fos-Neuronen in LA gefunden, während in CeA nur wenige markierte Neurone vorhanden waren. Die Anzahl an c-Fos-Neuronen in CeA war vergleichbar mit der Anzahl der Arg3.1-Neurone in CeA (siehe auch Tab. 3.1, 3.2 und Abb. 3.11). Im Gegensatz dazu führten die Salicylatinjektionen (Gruppe 2+4) im Vergleich zu Arg3.1 zu einer wesentlich höheren Anzahl an c-Fos-Neuronen in CeA und LA (Abb. 3.8, 3.11). In MeA waren in allen Behandlungsgruppen nur wenig c-Fos positive Neurone vorhanden.

Gyrus cingulus: Tiere aller Behandlungsgruppen zeigten c-Fos-Neurone in CG 2 und CG 3. Die Anzahl der c-Fos-Neurone war immer sehr viel höher, als die Anzahl der Arg3.1-Neurone in dieser Region. Die Verteilung der markierten Neurone war für beide IEGs vergleichbar, so zeigten die drei Tiere, in denen nach Salicylatinjektion mehr Arg3.1-Neurone in der rechten Hemisphäre vorhanden waren (Kap.3.1.4), auch mehr c-Fos-Neurone in dieser Hemisphäre. Bei allen anderen Tieren war die Anzahl der Arg3.1- und der c-Fos-Neuronen in beiden Hemisphären vergleichbar.

3.1.6 Quantitative Analyse

Arg3.1: Arg3.1-Neurone wurden in den Feldern AI und AAF des AC, in den Unterkernen CeA, MeA und LA der Amygdala und im CG quantifiziert. In Tabelle 3.1 ist Mittelwert an Arg3.1-Neuronen pro Schnitt für alle Behandlungsgruppen und alle untersuchten Gebiete dargestellt. Da es in keinem der untersuchten Gebiete zu signifikanten Unterschieden zwischen den Hemisphären kam, gehen die Werte beider Hemisphären eines Tieres in den Mittelwert ein. Um die Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu testen, wurde der einseitige Mann-Whitney U-Test eingesetzt (siehe 2.2.4.3).

Die Mittelwerte der Arg3.1-Neurone zeigten in den Feldern AI, AAF und im CG keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 3.9). Der niedrige Mittelwert nach akustischer Stimulation erklärt sich durch die zwei Tiere, die kaum Arg3.1-Neurone im AC aufwiesen, wodurch auch der hohe Wert für den Standardfehler in Abbildung 3.9 zu erklären ist.

		Tag 1 L13 I,m	Tag 2 LII,m	Tag 3 L9,w	Tag 4 L7,m	Tag 5 L7,w	Tag 6 L7,w	MW/Tier +/- SEM
AI	Salicylat	36 +/-15	58 +/-16	106 +/-45	28 +/-14	14 +/-10	13 +/-8	43 +/-14
	Stimulation	8 +/-5	168 +/-60	99 +/-32	2 +/-3	51 +/-14	60 +/-32	65 +/-25
	Saline	52 +/-41	50 +/-27	56 +/-26	83 +/-56	6 +/-13	25 +/-18	45 +/-11
AAF	Salicylat	9 +/-10	28 +/-16	47 +/-30	9 +/-10	2 +/-4	91 +/-50	31 +/-14
	Stimulation	5 +/-10	66 +/-16	71 +/-29	1 +/-0	69 +/-23	60 +/-36	46 +/-13
	Saline	2 +/-4	38 +/-22	21 +/-12	54 +/-32	9 +/-11	28 +/-30	25 +/-8
CeA	Salicylat	24 +/-18	38 +/-25	18 +/-10	30 +/-12	23 +/-16	14 +/-9	24 +/-3
	Stimulation	1 +/-0	2 +/-3	3 +/-2	1 +/-3	3 +/-4	4 +/-3	2 +/-0
	Saline	2 +/-2	1 +/-1	1 +/-2	1 +/-1	1 +/-2	2 +/-2	1 +/-0
LA	Salicylat	37 +/-23	54 +/-27	59 +/-17	48 +/-21	32 +/-21	47 +/-20	46 +/-4
	Stimulation	10 +/-6	45 +/-18	28 +/-17	10 +/-20	24 +/-10	25 +/-13	24 +/-5
	Saline	21 +/-15	19 +/-8	24 +/-15	13 +/-11	6 +/-4	18 +/-13	17 +/-3
MeA	Salicylat	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-1	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0
	Stimulation	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0
	Saline	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-0	1 +/-1	1 +/-0
CG	Salicylat	18 +/-9	46 +/-18	30 +/-19	20 +/-10	7 +/-4	52 +/-51	29 +/-5
	Stimulation	4 +/-3	76 +/-33	31 +/-17	1 +/-3	50 +/-25	27 +/-17	32 +/-8
	Saline	8 +/-7	43 +/-13	35 +/-13	35 +/-18	7 +/-6	5 +/-5	22 +/-5

Tab. 3.1 Mittelwerte und Standardabweichungen der Arg3.1-Neurone pro Schnitt

Dargestellt sind die Werte aller quantifizierten Gebiete nach akustischer Stimulation (NBW-8 kHz und 1 kHz; Gruppe 1), Salicylat- (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3). Die Mittelwerte wurden für jedes Gebiet aus 12 Zählungen berechnet (6 x linke und 6 x rechte Hemisphäre). Dabei sind die Werte so aufgetragen, dass Geschwisterpaare die an einem Tag behandelt wurden in einer Spalte zu finden sind. An Tag 1, 2 und 4 wurden nur männliche an Tag 3, 5 und 6 nur weibliche Tiere behandelt, dabei entstammten alle Tiere der Tage 4, 5 und 6 der Zuchtlinie L7, während an den drei anderen Tagen Tiere aus verschiedenen Zuchtlinien eingesetzt wurden. Rechts außen ist der Mittelwert pro Tier und der dazugehörige Standardfehler für jedes Gebiet und jede Behandlung aufgetragen. Neben den Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen, scheint die Immunoreaktivität tendenziell am stärksten zwischen Tieren verschiedener Abstammung zu schwanken. AAF - anteriores auditorisches Feld; AI - primäres auditorisches Feld, CeA - zentrale Amygdala, CG - Gyrus cinguli, LA - laterale Amygdala, MeA - mediale Amygdala

Obwohl die Mittelwerte der Arg3.1-Neurone zwischen den getesteten Behandlungsgruppen nicht stark variierte, zeigte sich eine deutliche, behandlungsabhängige Verteilung der Arg3.1-Neurone im AC. Dementsprechend wurden nach Salicylatinjektion auffällig viele der Arg3.1-Neurone im hochfrequenten Bereich an der Grenze zwischen AI und AAF gefunden (siehe auch Abb.3.3 und 3.4). Aus diesem Grund wurde die Häufigkeit bestimmt, mit der Arg3.1-Neurone im hochfrequenten Bereich des AC vorkamen. Dafür wurde die Anzahl der Neurone im hochfrequenten Bereich separat ermittelt und durch die Gesamtanzahl der Arg3.1-Neurone im AC geteilt. Ein Tier der Gruppe 2 zeigte eine völlig abweichende Verteilung der Neurone (siehe 3.1.2). Für dieses Tier wurde der Anteil der Arg3.1-Neurone im hochfrequenten Bereich nicht bestimmt. Es zeigte sich, dass Arg3.1-Neurone nach Salicylatinjektion mit 46% signifikant häufiger im hochfrequenten Bereich des AC vorlagen als nach Salineinjektionen, in denen Arg3.1-Neurone nur zu einem Anteil von 19% in diesem Bereich lokalisiert waren ($p < 0,001$, siehe Abb. 3.10). Auch in den akustisch stimulierten Tieren kamen Arg3.1-Neurone im Mittel häufiger im hochfrequenten Bereich des AC vor (26%) und der Unterschied zu der Salicylatgruppe war daher weniger stark ausgeprägt ($p < 0,01$). Dieser Befund entspricht der Erwartung, da zwei Tiere dieser Gruppe mit hochfrequenten akustischen Reizen stimuliert worden waren (NBW-8 kHz).

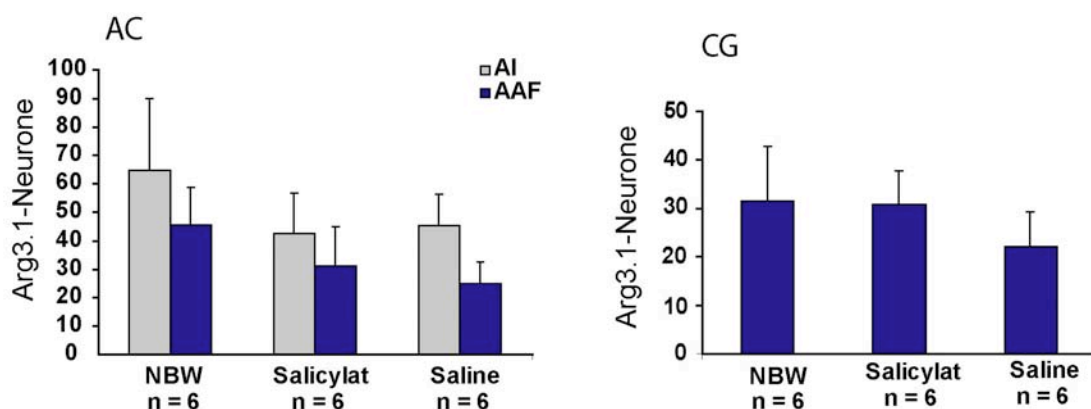


Abb. 3.9 Anzahl der Arg3.1-Neurone in AC und CG

Dargestellt sind die Mittelwerte der Arg3.1-Neurone und ihre Standardfehler nach akustischer Stimulation (NBW; Gruppe 1), Salicylatbehandlung (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3) für den AC und den CG. Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test getestet. Dabei wurden Werte aus der Salicylatgruppe separat gegen die Werte der akustisch stimulierten oder der salinebehandelten Tiere getestet. In AC und CG wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Arg3.1-Neurone zwischen den Gruppen gefunden. AAF - anteriores Feld des auditorischen Cortex, AC - auditorischer Cortex, AI - primäres Feld des auditorischen Cortex, CG - Gyrus cinguli

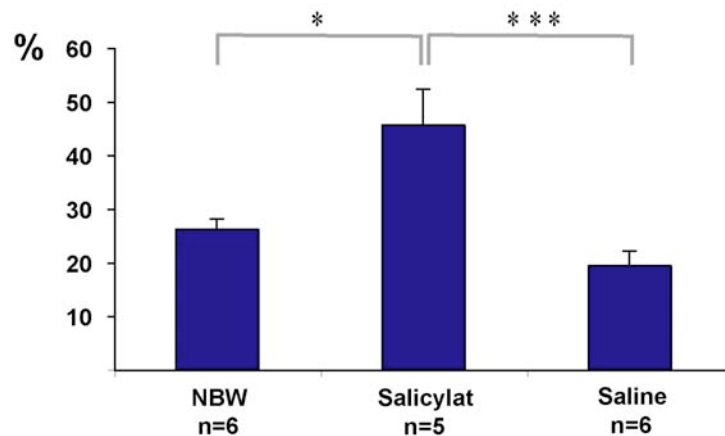


Abb. 3.10 Anteil der Arg3.1-Neurone im hochfrequenten Bereich des AC

Dargestellt ist der mittlere prozentuale Anteil der der Arg3.1-Neurone und die zugehörigen Standardfehler nach akustischer Stimulation (NBW; Gruppe 1), Salicylat- (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3). Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test getestet. Dabei wurden Werte aus der Salicylatgruppe separat gegen die Werte der akustisch stimulierten oder der salinebehandelten Tiere getestet. Es zeigt sich, dass der Anteil an Arg3.1-Neuronen im hochfrequenten Bereich des AC nach Salicylatinjektion gegenüber den anderen Behandlungsgruppen signifikant erhöht ist (* $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

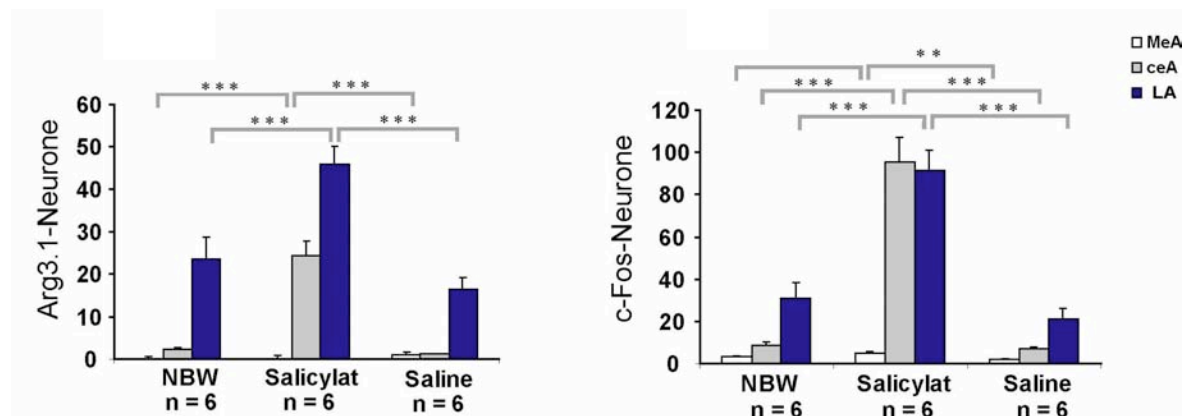


Abb. 3.11 Anzahl der Arg3.1 und c-Fos-Neurone in der Amygdala

Dargestellt sind die Mittelwerte der Arg3.1 und c-Fos-Neurone und ihr Standardfehler nach akustischer Stimulation (NBW; Gruppe 1), Salicylat- (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3), für MeA, CeA und LA. Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test getestet. Dabei wurden die Werte der Salicylatgruppe separat gegen die Werte der akustisch stimulierten oder der salinebehandelten Tiere getestet. Die Anzahl an Arg3.1 und c-Fos-Neurone in CeA und LA nach Salicylatinjektion war im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen signifikant erhöht. Die Anzahl an c-Fos-Neuronen in MeA war nach Salicylatgabe verglichen mit den salinebehandelten Tieren ebenfalls signifikant erhöht (** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$). CeA - zentraler Kern der Amygdala, LA - lateraler Kern der Amygdala, MeA - medialer Kern der Amygdala

In der Amygdala kam es ebenfalls zu hoch signifikanten Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen. Die Anzahl an Arg3.1-Neuronen in CeA war nach Salicylatinjektionen, verglichen mit den anderen beiden Gruppen, signifikant erhöht ($p < 0,001$). Gleichzeitig war die Anzahl an Arg3.1-Neuronen in LA doppelt so hoch, wie in den anderen beiden Gruppen ($p < 0,001$). In MeA wurden in allen Gruppen kaum Arg3.1-Neurone gefunden.

C-Fos: C-Fos-Neurone wurden in VCN, IC, MeA, CeA und LA quantifiziert. In Tabelle 3.2 sind die Mittelwerte der c-Fos-Neurone für alle Behandlungsgruppen und alle untersuchten Gebiete dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem einseitigen Mann-Whitney U-Test getestet. In VCN zeigten sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abb. 3.12). In den mit Salicylat behandelten Tieren wurden fast keine c-Fos-Neurone gefunden, während markierte Zellen nach akustischer Stimulation ($p < 0,005$) und Salinebehandlung ($p < 0,001$) deutlich erhöht waren. Dementsprechend wurden auch im IC nach Salicylatbehandlung weniger c-Fos-Neurone als in den anderen beiden Gruppen gefunden, die Unterschiede waren jedoch nicht so deutlich ($p < 0,01$; Abb. 3.13). In der Amygdala war die Anzahl an c-Fos-Neuronen nach Salicylatgabe in CeA ungefähr zehn mal ($p < 0,001$) und in LA ungefähr drei so hoch ($p < 0,001$) wie die Anzahl der c-Fos-Neurone nach akustischer Stimulation und Salinebehandlung. Ein Vergleich der Anzahl der c-Fos-Neurone und Arg3.1-Neurone in der Amygdala nach Salicylatbehandlung zeigte, dass c-Fos-Neurone in CeA ungefähr vier mal und in LA ungefähr zwei mal so häufig vorkommen wie Arg3.-Neurone. Im Gegensatz dazu war die Anzahl an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen nach akustischer Stimulation und Salinebehandlung vergleichbar. Dies ist ungewöhnlich, da im Cortex immer mehr c-Fos-Neurone als Arg3.1-Neurone gefunden wurden. In MeA war die Anzahl an c-Fos-Neuronen in allen Gruppen niedrig, dennoch war die Anzahl in salicylat-gegenüber den salinebehandelten Tieren signifikant erhöht ($p < 0,005$). Zwischen den akustisch stimulierten und den salicylatbehandelten Tieren gab es keine signifikanten Unterschiede in MeA.

c-Fos-Neurone		Tag 1 L13 I,m	Tag 2 LII,m	Tag 3 L9,w	Tag 4 L7,m	Tag 5 L7,w	Tag 6 L7,w	MW/Tier +/- SEM
CN	Salicylat	0 +/-0	0 +/-0	0 +/-1	0 +/-1	2 +/-3	0 +/-0	0 +/-0
	Stimulation	1 +/-1	37 +/-15	19 +/-11	0 +/-0	13 +/-8	15 +/-9	14 +/-5
	Saline	9 +/-10	5 +/-3	5 +/-8	1 +/-1	14 +/-6	4 +/-4	6 +/-2
IC	Salicylat	43 +/-25	81 +/-65	51 +/-37	93 +/-49	31 +/-18	47 +/-24	58 +/-10
	Stimulation	58 +/-47	175 +/-53	99 +/-38	82 +/-37	92 +/-52	73 +/-35	97 +/-17
	Saline	91 +/-44	106 +/-51	125 +/-49	131 +/-63	85 +/-41	54 +/-24	99 +/-12
CeA	Salicylat	83 +/-29	84 +/-40	106 +/-71	107 +/-72	143 +/-45	51 +/-17	96 +/-13
	Stimulation	4 +/-6	11 +/-6	5 +/-4	3 +/-3	15 +/-6	13 +/-13	9 +/-2
	Saline	8 +/-4	8 +/-7	5 +/-4	10 +/-4	7 +/-5	5 +/-2	7 +/-1
LA	Salicylat	105 +/-35	115 +/-81	111 +/-37	58 +/-14	99 +/-51	62 +/-23	92 +/-10
	Stimulation	25 +/-13	70 +/-33	23 +/-8	13 +/-7	34 +/-12	21 +/-11	31 +/-8
	Saline	39 +/-12	35 +/-18	22 +/-12	15 +/-8	10 +/-6	7 +/-4	21 +/-5
MeA	Salicylat	3 +/-5	7 +/-9	4 +/-4	9 +/-7	6 +/-11	2 +/-3	5 +/-1
	Stimulation	4 +/-4	4 +/-3	2 +/-2	2 +/-2	5 +/-5	2 +/-2	3 +/-1
	Saline	1 +/-2	4 +/-3	0 +/-0	3 +/-1	2 +/-3	1 +/-2	2 +/-1

Tab. 3.2 Mittelwerte und Standardabweichungen der c-Fos-Neurone pro Schnitt

Dargestellt sind die Werte aller quantifizierten Gebiete nach akustischer Stimulation (NBW- 8 kHz und 1 kHz; Gruppe 1), Salicylat- (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3). Die Mittelwerte wurden für jedes Gebiet aus 12 Zählungen berechnet (6 x linke und 6 x rechte Hemisphäre). Dabei sind die Werte so aufgetragen, dass Geschwisterpaare die an einem Tag behandelt wurden in einer Spalte zu finden sind. An Tag 1,2 und 4 wurden nur männliche an Tag 3,5 und 6 nur weibliche Tiere behandelt, dabei entstammten alle Tiere der Tage 4,5 und 6 der Zuchtlinie L7, während an den drei anderen Tagen Tiere aus verschiedenen Zuchtlinien eingesetzt wurden. Rechts außen ist der Mittelwert pro Tier und der dazugehörige Standardfehler für jedes Gebiet und jede Behandlung aufgetragen. Neben den Unterschieden zwischen den Behandlungsgruppen, scheint die Immunoreaktivität tendenziell am stärksten zwischen Tieren verschiedener Abstammung zu schwanken. CeA - zentrale Amygdala, CN - Nucleus cochlearis, IC - Colliculus inferior, LA - laterale Amygdala, MeA - mediale Amygdala

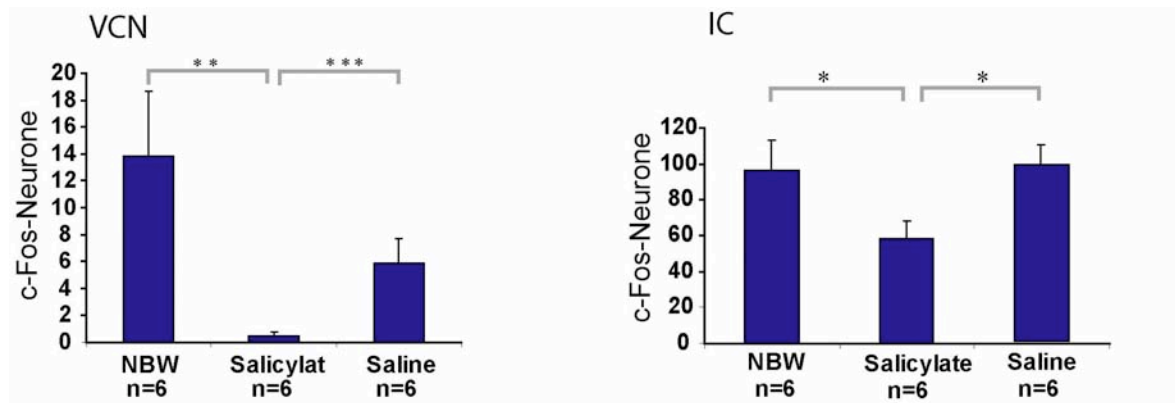


Abb. 3.12 Vergleich der Anzahl der c-Fos-Neurone im VCN und IC

Dargestellt sind die Mittelwerte der c-Fos-Neurone und ihr Standardfehler nach akustischer Stimulation (NBW; Gruppe 1), Salicylat- (Gruppe 2) und Salinebehandlung (Gruppe 3) für den CN und den IC. Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney U-Test getestet. Dabei wurden die Werte der Salicylatgruppe separat gegen die Werte der akustisch stimulierten oder der salinebehandelten Tiere getestet. In VCN und IC war die Anzahl an c-Fos-Neuronen nach den Salicylatinjektion, verglichen mit den beiden anderen Gruppen, signifikant niedriger (* $p < 0,01$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,001$). IC - Colliculus inferior, VCN - ventraler Nucleus Cochlearis,

3.2 Ergebnisse aus Versuchsreihe 2: Einfluss des Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin auf die Arg3.1- und c-Fos-Produktion nach Salicylatinjektion

Arg3.1-Neurone wurden in der zentralen Amygdala (CeA) nach Salicylatinjektion fast ausschließlich in ihrer lateralen Untereinheit (CeL) gefunden. In der Ratte projizieren Neurone aus CeL in den cholinergen Teil des basalen Vorderhirns (Jolkonnen et al., 2002). Zudem ist bekannt, dass plastische Veränderungen im Cortex durch Stimulation dieser Region des basalen Vorderhirns oder durch die Gabe von Acetylcholinrezeptor-Agonisten oder Antagonisten beeinflusst werden können (Metherate und Ashe, 1991; Bjordahl et al., 1998; Kilgard und Merzenich, 1998; Weinberger und Bakin, 1998; Weinberger, 2003; Ma und Suga, 2003; siehe auch 4.6). Die Experimente dieser Versuchsreihe dienten zur Überprüfung der Annahme, dass die Arg3.1- und c-Fos-Proteinbildung nach Salicylatgabe durch eine Blockade der muscarinergen Acetylcholinrezeptoren im Cortex vermindert werden kann. Es wurden insgesamt acht Tiere untersucht. Vier Tiere bekamen eine einmalige Salicylatinjektion (Gruppe 6), bei vier anderen wurde der Salicylatlösung der Acetylcholinrezeptor-Antagonist Scopolamin zugesetzt (Gruppe 7). Scopolamin blockiert

unselektiv alle muscarinergen Acetylcholinrezeptoren. Es wurden immer zwei Tiere, je ein Tier pro Versuchsgruppe, zeitgleich behandelt. Die Verteilung der Arg3.1 und c-Fos-Neurone in Gehirnen der salicylatbehandelten Tiere (Gruppe 6) entsprach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Verteilung dieser Neurone. Dementsprechend waren Arg3.1-Neurone im AC meist an der Grenze zwischen AI und AAF lokalisiert und c-Fos-Neurone kamen wesentlich häufiger vor und zeigten eine breite Verteilung in rostro-caudaler Ausdehnung und eine Häufung in den Schichten III und IV. Zudem war die Anzahl an Arg3.1 und c-Fos-Neuronen in der Amygdala und dort vor allem in CeA stark erhöht. Interessanterweise führte die zusätzliche Gabe von Scopolamin in allen Tieren der Gruppe 7 zu einer Reduktion der Arg3.1 und c-Fos bildenden Neurone im AC (Abb.3.13), während die Anzahl an markierten Neuronen in CeA mit Tieren vergleichbar war, die nur Salicylat injiziert bekommen hatten (Abb. 3.14). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob Scopolamin in einer Konzentration von 3 mg/kg oder 5 mg/kg verabreicht wurde.

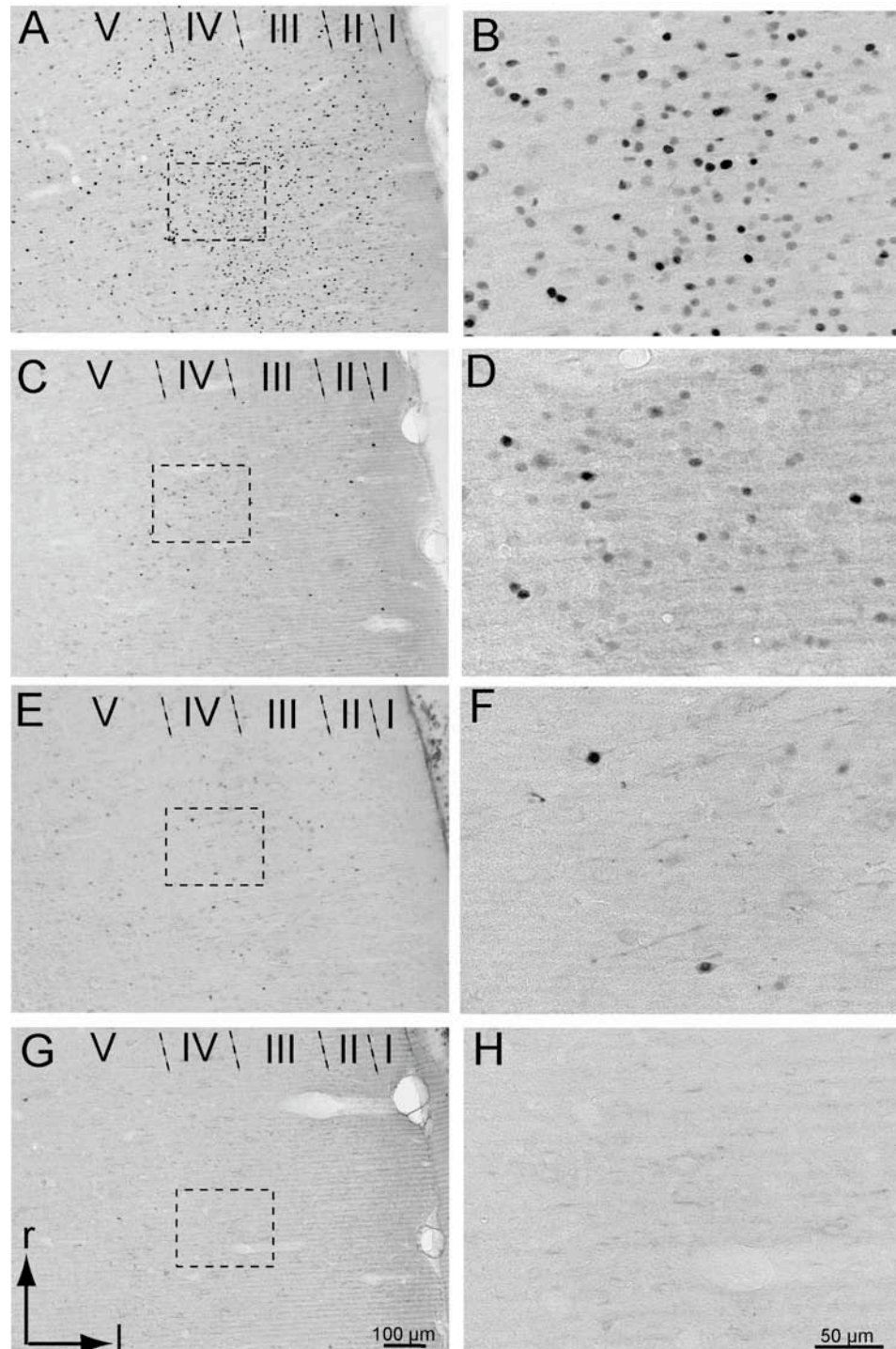


Abb. 3.13 Beeinflussung der Arg3.1- und c-Fos-Bildung im AC durch die Gabe von Scopolamin

Dargestellt ist der Vergleich der Arg3.1 und c-Fos-Neurone nach reiner Salicylatgabe (Gruppe 6) mit einer kombinierten Gabe von Salicylat und dem Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin (Gruppe 7) im hochfrequenten Bereich des AC. Eingerahmte Bereiche **A,C,E,G** sind in **B,D,F,H** vergrößert dargestellt. I-V repräsentieren die verschiedenen corticalen Schichten **A+B**: C-Fos-Neurone nach Salicylatgabe (Gruppe 6). **C+D**: C-Fos-Neurone nach kombinierter Salicylat- und Scopolamingabe (Gruppe 7). **E+F**: Arg3.1-Neurone nach Salicylatgabe (Gruppe 6). **G+H**: Arg3.1-Neurone nach kombinierter Salicylat- und Scopolamingabe (Gruppe 7). Salicylatinjektionen (**A,B** und **E,F**; Gruppe 6) führten zu einer massiven c-Fos-Bildung und einer mit anderen salicylatbehandelten Tieren vergleichbaren Arg3.1-Bildung im AC. Die zusätzliche Gabe von Scopolamin führte zu einer Reduktion der c-Fos-Neurone und einer Unterdrückung der Arg3.1-Bildung. AC - auditorischer Cortex, l - lateral, r - rostral

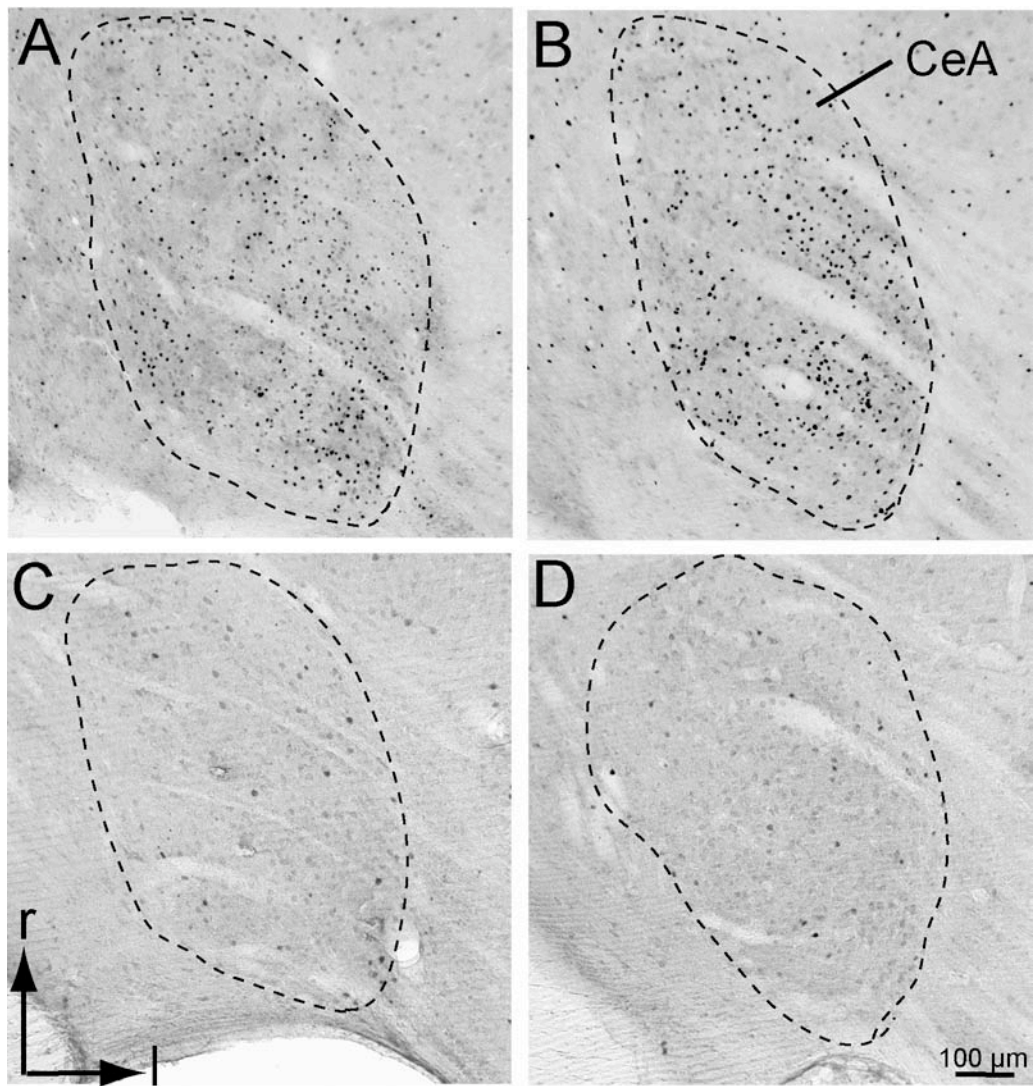


Abb. 3.14 Beeinflussung der Arg3.1- und c-Fos-Bildung in CeA durch die Gabe von Scopolamin

Dargestellt ist der Vergleich der Arg3.1- und c-Fos-Neurone nach reiner Salicylatgabe (Gruppe 6) mit einer kombinierten Gabe von Salicylat und dem Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin (Gruppe 7). Nach Salicylatinjektion werden viele c-Fos-Neurone in CeA gefunden (A, Gruppe 6). Die kombinierte Gabe von Salicylat und Scopolamin führt zu einer vergleichbaren Menge an c-Fos-Neuronen in CeA (B, Gruppe 7). Auch die Anzahl der Arg3.1-Neurone unterscheidet sich nicht zwischen Salicylat (C) und Salicylat kombiniert mit Scopolamin (D). CeA - zentraler Kern der Amygdala, l - lateral, r - rostral

3.3 Ergebnisse aus Versuchsreihe 3: Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylatinjektion durch *in situ*-Hybridisierung

3.3.1 Allgemeine Beobachtungen

Insgesamt wurden in dieser Versuchsreihe sechs Tiere untersucht, vier erhielten eine einmalige Salicylatinjektion (350 mg/kg), zwei wurden mit einer physiologischen Kochsalzlösung (Saline) behandelt. Dabei wurden immer zwei Salicylat- und ein Salinetier gleichzeitig behandelt (CM 74 -76 und CM 77- 79, siehe auch Tab. 2.1). Die Schnitte von drei Tieren wurden jeweils auf einen Objektträger aufgezogen und daher simultan mit den gleichen Lösungen behandelt. Die Inkubation mit der *sense* und der anti-*sense*-Sonde führte zu Schwärzungen in den aufgelegten Röntgenfilmen.

Die Inkubation mit der *sense*-Sonde führte in salicylat- und salinebehandelten Tieren, mit Ausnahme des Hippocampus, zu einer unspezifischen Markierung aller Hirnregionen. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit der anti-*sense*-Sonde unabhängig von der Behandlung zu spezifischen Markierungen im Hippocampus, im Striatum, in der Formatio reticularis, in verschiedenen limbischen Gebieten und in den Schichten II, III, IV und VI des Cortex.

3.3.2 Lokalisation der *arg3.1*-mRNA im auditorischen Cortex

Insgesamt konnte im AC kein signifikanter Unterschied in der Lokalisation der *arg3.1*-mRNA gefunden werden. In Abb. 3.15 sind repräsentative Schnitte aus dem Bereich des auditorischen Cortex gezeigt. Bei den Tieren CM 74-76 (Abb. 3.15, A,D,C) kam es nach Salinebehandlung im Vergleich zur Salicylatbehandlung nach Inkubation mit der anti-*sense*-Sonde zu einer schwächeren Markierung in den Schichten II, III, IV und VI des AC und CG. Im Gegensatz wurden bei den Tieren CM 77-79 (Abb.3.15, B,E,F) zwischen den salicylat- und dem salinebehandelten Tieren keine deutlichen Unterschiede in der Intensität der Markierung gefunden. Obwohl es nicht zu einheitlichen Unterschieden in der Menge der *arg3.1*-mRNA kam, sah es so aus, als ob die *arg3.1*-mRNA an unterschiedlichen Positionen entlang der rostro-caudalen Ausdehnung maximal war. Nach Salicylatinjektion wurden solche Maxima vermehrt im hochfrequenten Bereich des AC gefunden (Abb. 3.15, A,B, Pfeile). Die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA war somit in Bereichen maximal, in

denen auch Arg3.1-Proteinbildung maximal war (siehe 3.1.2). Nach Salineinjektion wurden ebenfalls lokale Maxima gefunden, diese waren aber meist an anderen Orten entlang der rostro-caudalen Ausbreitung lokalisiert (Abb.3.15, D, E, Pfeile).

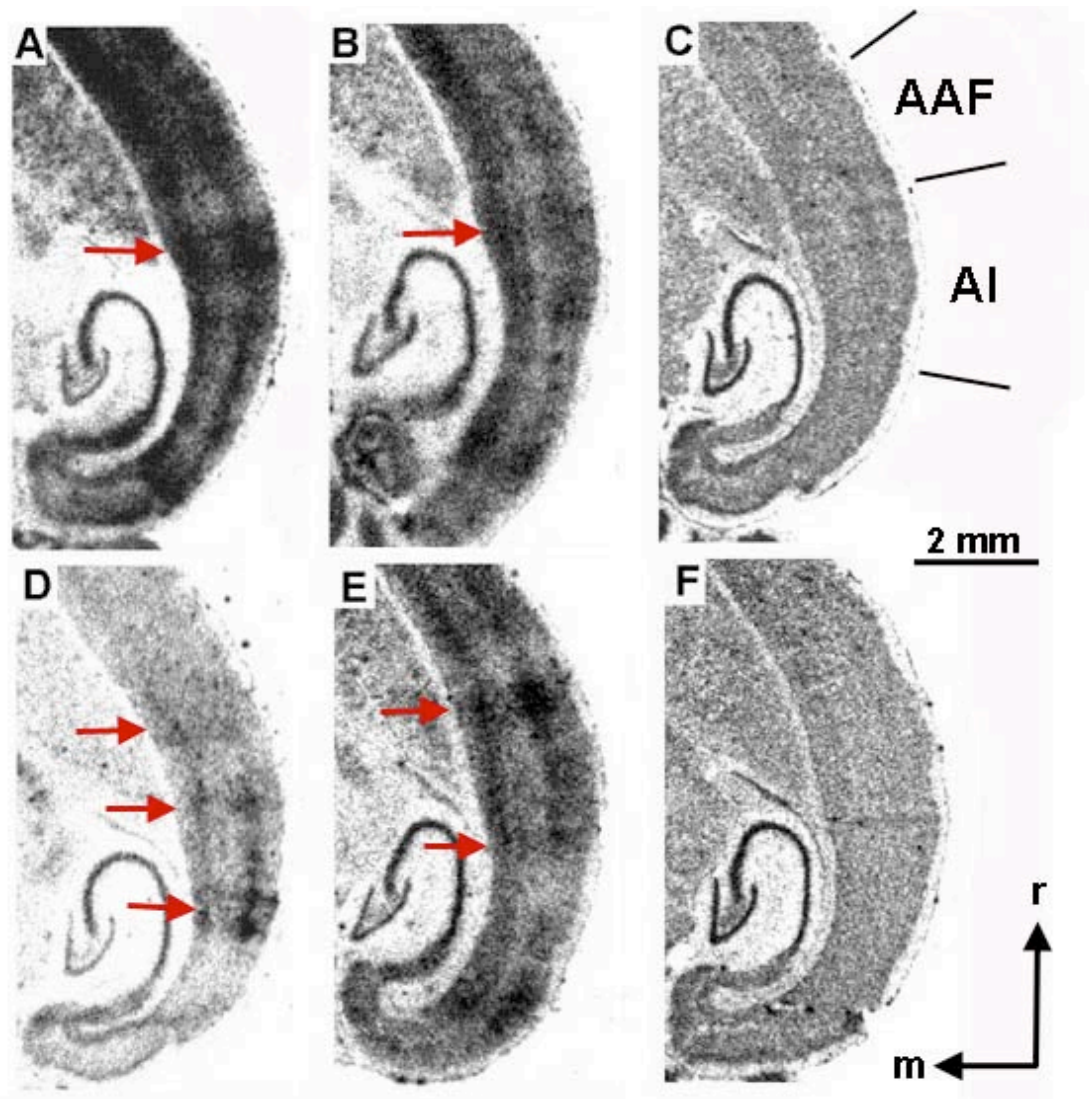


Abb. 3.15 Lokalisation der *arg3.1*-mRNA im AC

Dargestellt ist die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylat- (A,B,C) und Salinebehandlung (D,E,F). Die *arg3.1*-mRNA wurde mittels einer radioaktiven *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Gezeigt sind Fotografien von Röntgenfilmen, die auf die hybridisierten Schnitte aufgelegt wurden. Eine Schwärzung im Röntgenfilm entspricht einer starken Bindung der Sonde und damit einer erhöhten Menge an *arg3.1*-mRNA. Die Schnitte A,D,C und B,E,F wurden jeweils mit den gleichen Lösungen behandelt und entstammen Tieren, die am gleichen Tag behandelt wurden. Die Inkubation mit der anti-sense Sonde (A,B,D,F) führte zu einer spezifischen Markierung der Schichten II, III, IV und VI, während die Inkubation mit der sense-Sonde in einer schwachen unspezifischen Markierung des AC resultierte (C,F). Zwischen den salicylat- (A,B) und salinebehandelten Tieren (D,E) konnte kein einheitlicher Unterschied in der Intensität der Markierung gefunden werden. Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Lokalisation der lokalen Maxima der *arg3.1*-mRNA entlang der rostro-caudalen Ausdehnung. Nach Salicylatbehandlung lagen diese Maxima vermehrt im hochfrequenten Bereich des AC.

3.3.3 Lokalisation der *arg3.1*-mRNA in der Amygdala

Im Gegensatz zum AC wurden in der Amygdala deutliche Unterschiede in der Intensität der Markierung zwischen salicylat- und salinebehandelten Tieren festgestellt. Alle salicylatbehandelten Tiere zeigten eine sehr intensive Schwärzung im Bereich der zentralen Amygdala, während die Amygdala der Kontrolltiere nur sehr schwach, bzw. gar nicht markiert war (siehe Abb. 3.16). Auch im Bereich der basolateralen Amygdala kam es zu einer Schwärzung, die sich von den benachbarten Gebieten abhob. Dennoch konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen gefunden werden.

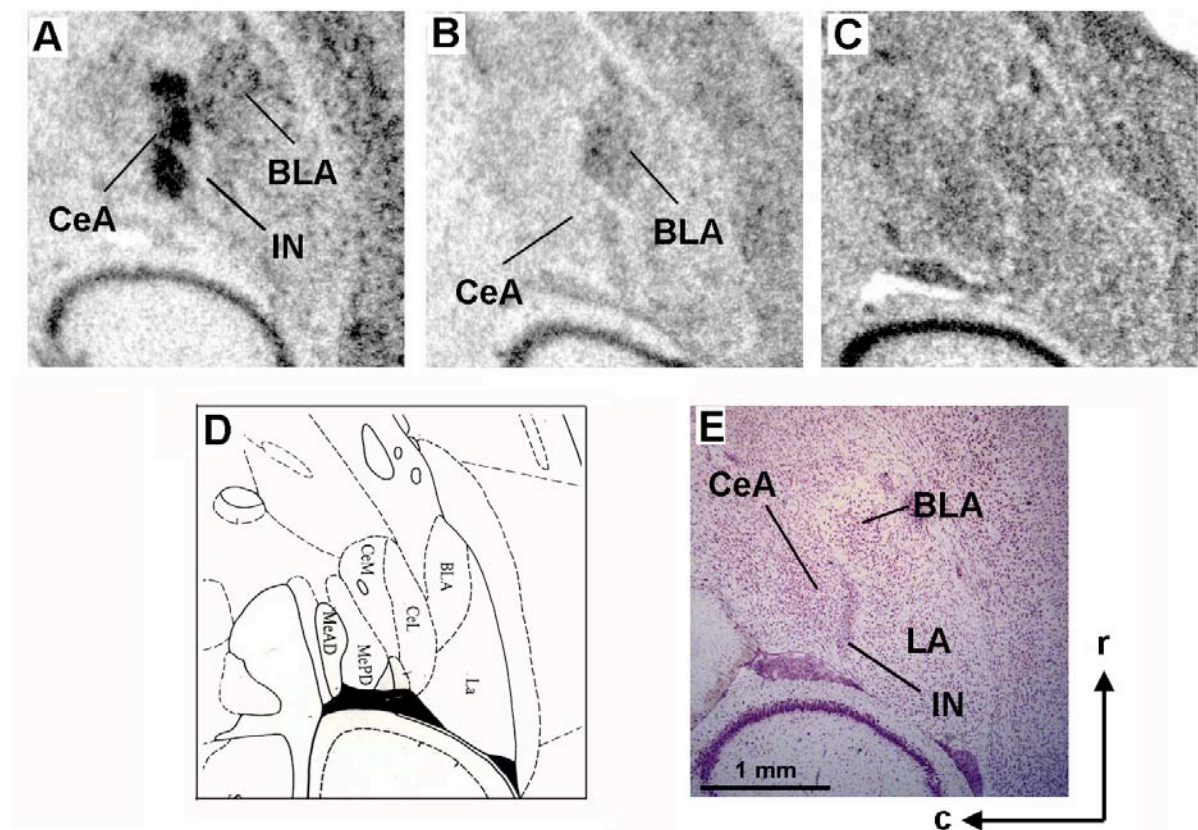


Abb. 3.16 Lokalisation der *arg3.1*-mRNA in der Amygdala

Dargestellt ist die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylat- (A) und Salinebehandlung (B). Die *arg3.1*-mRNA wurde mittels einer radioaktiven *in situ*-Hybridisierung nachgewiesen. Dafür wurden Schnitte entweder mit einer anti-sense Sonde (A,B) oder zur Kontrolle mit einer sense-Sonde (C) inkubiert. Gezeigt sind Fotografien von Röntgenfilmen, die auf die hybridisierten Schnitte aufgelegt wurden. Eine Schwärzung im Röntgenfilm entspricht einer starken Bindung der Sonde und damit einer erhöhten Menge an *arg3.1*-mRNA. D: Übersicht über die Unterkerne der Amygdala entnommen aus dem Rattenatlas von Paxinos und Watson (1986). E: Nissl-Färbung eines zu A benachbarten Schnitts. In der Wüstenrennmaus ist der IN wesentlich deutlicher ausgeprägt als in der Ratte und dient als Leitstruktur für die Lokalisation der CeA. Nur die Inkubation mit der anti-sense Sonde führte zu einer spezifischen Markierung in der Amygdala (A,B). Nach Salicylatbehandlung kam es zu einer starken Markierung der CeA (A), während eine schwächere Markierung der BLA nach Salicylat- und Salinebehandlung zu beobachten war. BLA - basolaterale der Amygdala, CeA - zentrale Amygdala, LA - laterale Amygdala, IN - interkalierender Nucleus der Amygdala, MeAD - anteriorer dorsaler Teil der medialen Amygdala, MePD posteriorer - dorsaler Teil der medialen Amygdala

3.4 Ergebnisse aus Versuchsreihe 4: Charakterisierung der Arg3.1-Neurone über Fluoreszenz-Doppelfärbungen

3.4.1 Allgemeine Beobachtungen

In allen Tieren dieser Versuchsreihe führten die Salicylatinjektionen zu Arg3.1-Proteinbildung in den unter 3.1. beschriebenen Gebieten. Die Auswahl der Schnitte erfolgte nach den unter 2.2.4.1 beschriebenen Kriterien. Im auditorischen Cortex (AC) wurden die Arg3.1 markierten Neurone meist im hochfrequenten Bereich von AI an der Grenze zu AAF gefunden. Dort lagen sie in allen corticalen Schichten vor wurden aber am häufigsten in den Schichten II/III und VI gefunden. Auch in der zentralen Amygdala (CeA) kam es zu einer deutlichen Markierung der Arg3.1-Neurone. In vielen Tieren wurde neben der Färbung der Neurone auch eine Markierung der apikalen Dendriten gefunden. Dennoch war die Sensitivität der Fluoreszenzfärbung geringer, als die des unter 2.2.3 beschriebenen immunhistochemischen Verfahrens mit DAB als Chromogen. Die Anzahl der markierten Neurone pro Schnitt war insgesamt geringer und es wurden nur die Zellkerne, nicht aber die Somata der Neurone gefärbt.

3.4.2 Arg3.1/Nissl-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Die Arg3.1/Nissl-Doppelfärbung wurde an insgesamt 34 Schnitten aus sieben Tieren durchgeführt. In 30 Schnitten wurde die Größe von insgesamt 225 Arg3.1-Neurone untersucht. 11 Schnitte entstammten dem Bereich der Amygdala und 23 dem Bereich des AC und des CG. In Abbildung 3.18 sind charakteristische Beispiele aus dem Bereich des AC gezeigt. Der verwendete Nissl-Fluoreszenzfarbstoff führte zu einer Färbung der Zellkerne von Neuronen und Gliazellen. Über die Untersuchung der Kolo-kalisation von Arg3.1 und der Nissl-Substanz zeigte sich deutlich, dass Arg3.1 ausnahmslos in neuronalen Zellen gebildet wurde. Um die Arg3.1-Neurone näher zu charakterisieren, wurde der Durchmesser dieser Neurone bestimmt (siehe 2.5.2). Die Nissl-Fluoreszenzfärbung resultierte nicht wie erwartet (2.4.3) in einer Markierung der Zellkörper, sondern in einer Anfärbung der Zellkerne. Da bei neuronalen Zellen der Zellkern nahezu den gesamten Zellkörper ausfüllt (siehe Abb. 3.1), konnte von den Ausmaßen der Zellkerne der Arg3.1-Neurone auf ihre Somagröße geschlossen werden. Es

zeigte sich, dass der Durchmesser der Zellkerne der Arg3.1-Neurone zwischen 8 und 18 μm schwankte, wobei Neurone mit einem Zellkerndurchmesser zwischen 11 und 13 μm am häufigsten gefunden wurden (siehe Abb.3.17)

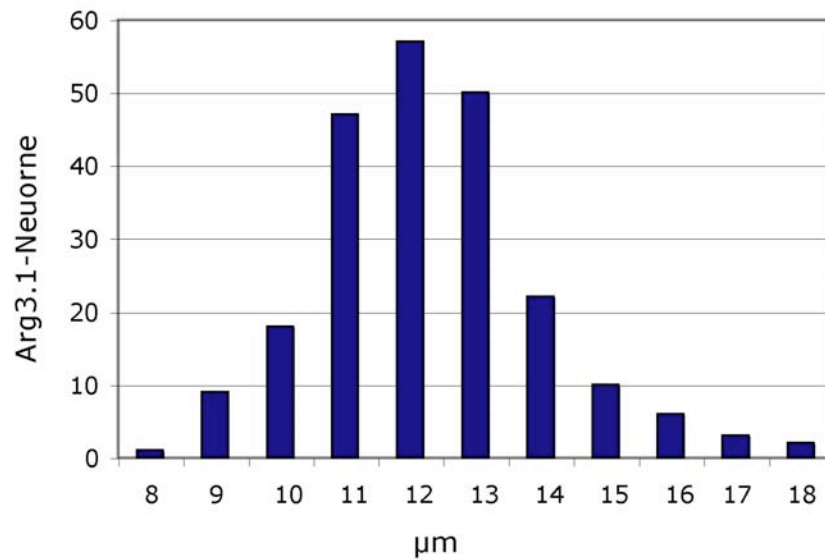


Abb. 3.17 Größe der Arg3.1-Neurone in μm

Es zeigt sich, dass Arg3.1 am häufigsten in Neuronen mit einem Zellkerndurchmesser von zwischen 11 und 13 μm gebildet wird. Da der Zellkern das gesamte Soma einnimmt, entspricht dies recht genau der Somagröße.

3.4.3 Arg3.1/GABA-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Es wurden alle Arg3.1-Neurone in 41 Schnitten aus insgesamt fünf mit Salicylat behandelten Tieren untersucht, dabei stammten 17 Schnitte aus dem Bereich der Amygdala und 24 Schnitte aus dem Bereich des AC. Durch wechseln des Anregungsfilters (siehe 2.5.2) wurde überprüft, ob Arg3.1-Neurone auch GABA positiv waren. In allen untersuchten Schnitten konnten Arg3.1 und GABA positive Neurone gefunden werden. Abbildung 3.19 zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus dem Bereich des AC. Die GABA-Färbung resultierte in einer Markierung des Somas und der proximalen Dendriten, während die Arg3.1 nur im Zellkern angefärbt wurden. Die Intensität der GABA-Färbung schien von den äußeren Cortexschichten (I-IV) bis hin zu den medialen Thalamuskernen abzunehmen. Da GABA ein sehr kleines Molekül ist, kann es beim Schneiden des Gehirns leicht ausgewaschen werden. Dem könnte durch eine stärkere Fixierung, z.B. über eine größere Menge Glutardialdehyd, vorgebeugt werden. Da eine stärkere Fixierung jedoch die Bindung des anti-Arg3.1-Antikörpers verhindert, konnte in der vorliegenden Arbeit keine stärkere Fixierung zum Einsatz gebracht werden und es kann daher keine Aussage über die Kolokalisation von Arg3.1 und GABA in der Amygdala gemacht werden. Für den Cortex entsprach die Menge an GABA gefärbten Neuronen dem beschriebenen Anteil an inhibitorischen Neuronen im Neocortex (Braitenberg und Schüz, 1991) und es zeigt sich deutlich, dass Arg3.1 und GABA nie in denselben Neuronen lokalisiert war. Vermutlich wurde der Cortex etwas stärker fixiert, da die Gehirne nach der Perfusion im Fixativ für drei Stunden nachfixiert wurden und das Fixativ dementsprechend vermehrt die peripher gelegenen corticalen Areale erreichte.

3.4.4 Arg3.1/c-Fos-Fluoreszenz-Doppelfärbung

Insgesamt wurden 81 Schnitte von 11 Tieren untersucht. Dabei entstammten 27 Schnitte dem Bereich der Amygdala und 64 dem Bereich des AC und CG. Wie unter 3.1 beschrieben, war die Anzahl an cFos bildenden Zellen immer wesentlich höher als die der Arg3.1-bildenden Neurone. Die Kolokalisation der Proteine wurde in allen Gebieten der genannten Schnitte untersucht. In Abbildung 3.20 ist ein charakteristisches Beispiel für die Kolokalisation von Arg3.1 und c-Fos im AC gezeigt und in Abbildung 3.21 für die Amygdala. Es zeigte sich, dass unabhängig von den untersuchten Gebieten alle Arg3.1-Neurone auch c-Fos positiv waren.

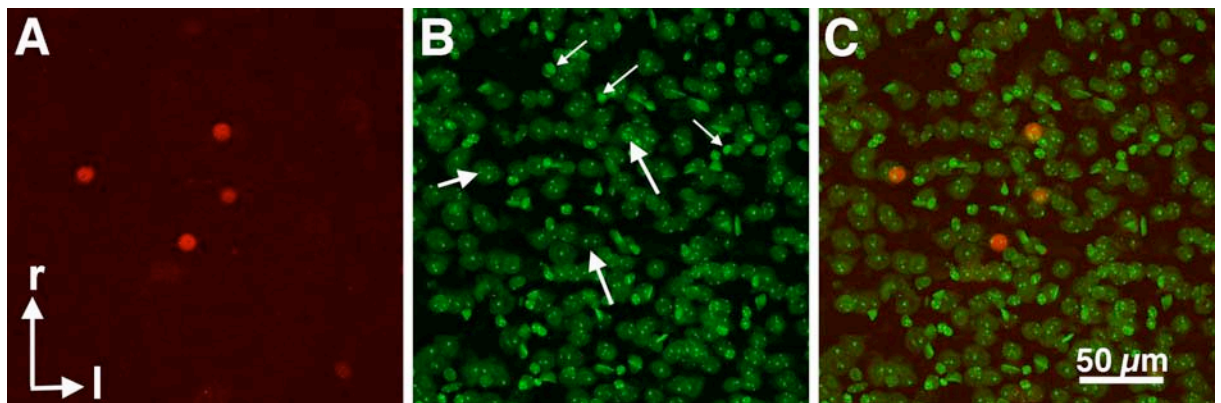


Abb. 3.18 Fluoreszenz-Doppelfärbung für Arg3.1 und die Nissl-Substanz im auditorischen Cortex

Die Bilder wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops aufgenommen. Arg3.1 ist in rot dargestellt und wurde über Cy2 nachgewiesen. Cy2 wurde mit der 488 nm Linie eines Ar-Lasers angeregt und bei 505-540 nm detektiert. Die Nissl-Substanz ist in grün dargestellt und wurde mit der 543 Linie eines HeNe-Lasers angeregt und bei 580-700 nm detektiert. In **A** sind Arg3.1-Neurone im primären auditorischen Feld AI zu sehen, in **B** die grün markierte Nissl-Substanz im gleichen Schnitt. Große Pfeile markieren Neurone, kleine Pfeile Gliazellen. **C** zeigt die Projektion beider Fluoreszenzen. Man sieht, dass Arg3.1 nur in Neuronen gebildet wird.

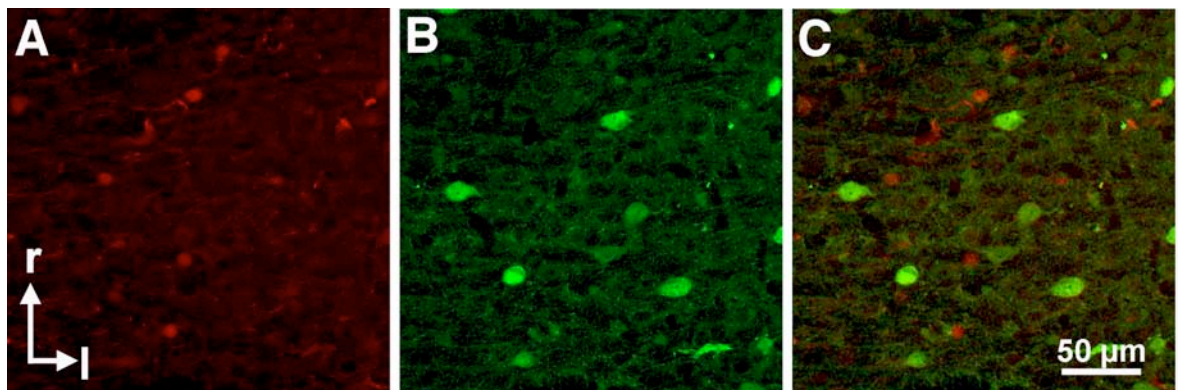


Abb. 3.19 Fluoreszenzdoppelfärbung für Arg3.1 und GABA im auditorischen Cortex

Die Bilder wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops aufgenommen. Arg3.1 ist in rot dargestellt und wurde über Cy2 nachgewiesen. Cy2 wurde mit der 488 nm Linie eines Ar-Lasers angeregt und bei 505-540 nm detektiert. GABA ist in grün dargestellt und wurde über Cy3 nachgewiesen. Cy3 wurde mit der 543 Linie eines HeNe-Lasers angeregt und bei 580-700 nm detektiert. In **A** sind Arg3.1-Neurone im primären auditorischen Feld AI zu sehen, in **B** die GABA-Markierung im gleichen Schnitt. **C** zeigt die Projektion beider Fluoreszenzen. Es zeigt sich, dass die GABAergen Neurone kein Arg3.1 bilden.

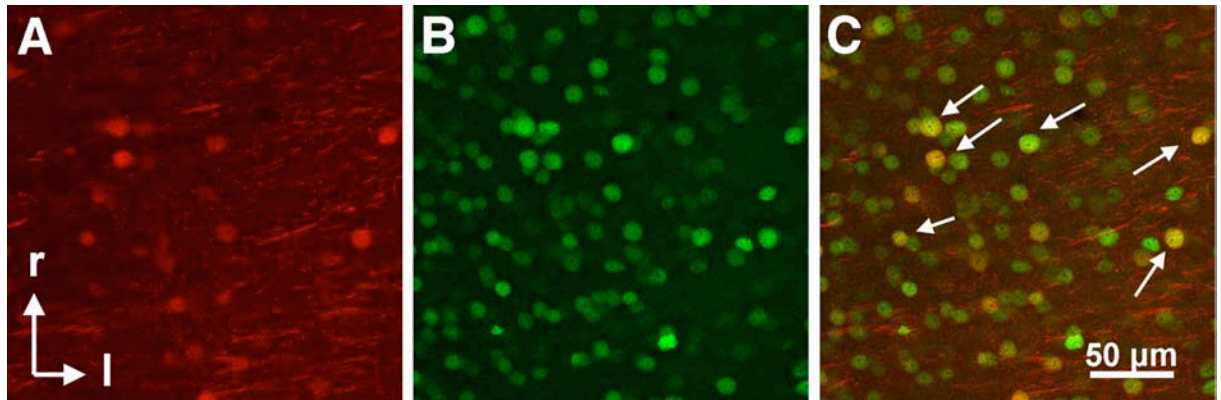


Abb. 3.20 Fluoreszenzdoppelfärbung für Arg3.1 und c-Fos im auditorischen Cortex

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus dem primären auditorischen Feld AI der rechten Hemisphäre. Die Bilder wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops aufgenommen. Arg3.1 ist in rot dargestellt und wurde über Cy2 nachgewiesen. Cy2 wurde mit der 488 nm Linie eines Ar-Lasers angeregt und bei 505-540 nm detektiert. C-fos ist in grün dargestellt und wurde über Cy3 nachgewiesen. Cy3 wurde mit der 543 Linie eines HeNe-Lasers angeregt und bei 580-700 nm detektiert. In **A** sind Arg3.1 gefärbte Neurone zu sehen, in **B** die c-Fos-Markierung im gleichen Schnitt. **C** zeigt die Projektion beider Fluoreszenzen. Man sieht, dass alle Arg3.1-Neurone auch c-Fos-positiv sind. Doppelt markierte Neurone erscheinen gelb und sind durch weiße Pfeile angezeigt.

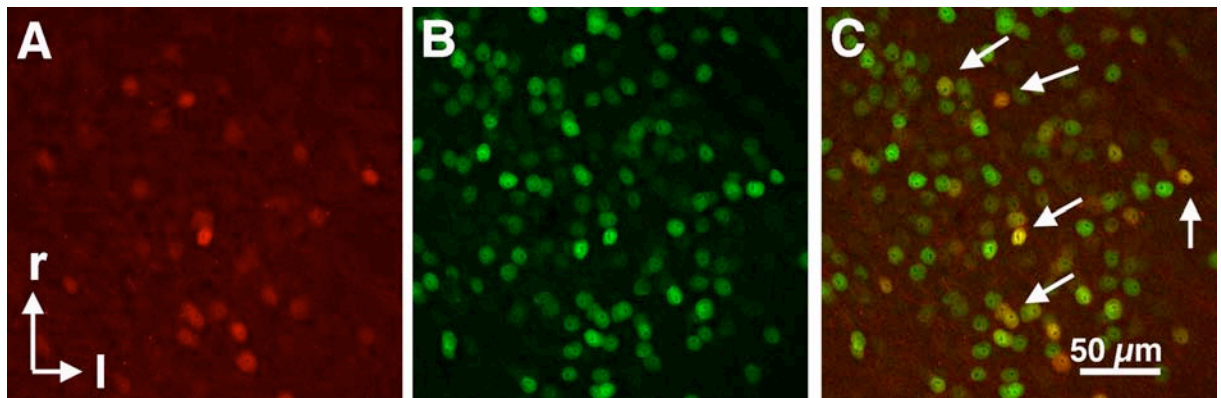


Abb. 3.21 Fluoreszenzdoppelfärbung für Arg3.1 und c-Fos in der zentralen Amygdala (CeA)

Die Bilder wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops aufgenommen. Arg3.1 ist in rot dargestellt und wurde über Cy2 nachgewiesen. Cy2 wurde mit der 488 nm Linie eines Ar-Lasers angeregt und bei 505-540 nm detektiert. C-Fos ist in grün dargestellt und wurde über Cy3 nachgewiesen. Cy3 wurde mit der 543 Linie eines HeNe-Lasers angeregt und bei 580-700 nm detektiert. In **A** sind Arg3.1-Neurone in CeA zu sehen, in **B** die c-Fos-Markierung im gleichen Schnitt. **C** zeigt die Projektion beider Fluoreszenzen. Man sieht, dass alle Arg3.1-Neurone auch c-Fos-positiv sind. Doppelt markierte Neurone erscheinen gelb und sind durch weiße Pfeile angezeigt.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Arg3.1 wird nach akustischer Stimulation in AI und AAF vermehrt in Neuronen gebildet, die den Frequenzgehalt des Stimulus repräsentieren. Innerhalb der corticalen Schichten zeigen sie dabei ein Maximum in den Schichten III und IV.
2. Nach Salicylatinjektionen liegen Arg3.1-Neurone vermehrt im hochfrequenten Bereich des AC vor und sind dort über alle Schichten gleichmäßig verteilt.
3. Nach akustischer Stimulation und Salicylatbehandlung kommen c-Fos-Neurone im AC immer sehr viel häufiger vor als Arg3.1-Neurone. Sie sind über breitere Frequenzbereiche verteilt und zeigen nach allen Behandlungen ein Maximum in den corticalen Schichten III und IV.
4. Die Verteilung des c-Fos-Proteins nach Salicylatgabe stimmt mit früheren Untersuchungen überein.
5. Die Salinebehandlung führt je nach der Intensität der Umgebungsgeräusche zu unterschiedlichen Ergebnissen. Dabei liegen nach lauten Umgebungsgeräuschen Arg3.1- und c-Fos-Neurone im AC vor, zeigen aber keine einheitliche Verteilung. Nach Salinebehandlung in gewohnter akustischer Umgebung werden dagegen keine Arg3.1- und nur wenig c-Fos-Neurone gefunden.
6. In subcorticalen auditorischen Gebieten (VCN, IC) ist die Anzahl an c-Fos-Neuronen nach Salicylatinjektion signifikant niedriger als nach akustischer Stimulation und Salinebehandlung.
7. In CeA und LA kommt es nur nach Salicylatinjektion zu einer erhöhten Bildung des Arg3.1- und c-Fos-Proteins. Dabei ist die Anzahl der c-Fos-Neurone immer wesentlich höher als die der Arg3.1-Neurone.
8. Auch die *arg3.1*-mRNA ist in CeA nur nach Salicylatinjektion stark erhöht.
9. Nach Salicylatgabe wird Arg3.1 in einer Untergruppe c-Fos bildender, exzitatorischer Pyramidenzellen gefunden.
10. Die Gabe des muscarinergen Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin zusammen mit Salicylat führt im Vergleich zu einer reinen Salicylatgabe im AC zu einer Unterdrückung der Arg3.1- und einer Reduktion der c-Fos-Bildung, während die Anzahl der markierten Neurone in CeA nach beiden Behandlungen vergleichbar ist.

4 Diskussion

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Wirkung des Salicylats

In der vorliegenden Arbeit wurde Natriumsalicylat (Salicylat) eingesetzt, um bei Mongolischen Wüstenrennmäusen Tinnitus auszulösen. Dass Salicylat zu einem verminderten Hörvermögen und zu Tinnitus führt, wurde zunächst an Patienten entdeckt, die wegen einer rheumatischen Arthritis mit hohen Dosen Salicylat behandelt wurden (McFadden und Plattsmier, 1983; McFadden et al., 1984). Verabreicht man Ratten Salicylat, in einer mit der vorliegenden Arbeit vergleichbaren Konzentration (350 mg/kg), dann nehmen sie in Abwesenheit externer Schallquellen Geräusche wahr (Jastreboff et al., 1988; Jastreboff und Brennan, 1994; siehe auch 1.3.2). Zudem wurde gezeigt, dass Salicylat in Wüstenrennmäusen zu einer Aktivierung des auditorischen Cortex (AC) führt, während der auditorische Eingang bis zum Colliculus inferior (IC) reduziert ist (Wallhäusser-Franke et al., 1996). Auch beim Tinnituspatienten wird eine erhöhte Aktivität im AC gefunden, die als Korrelat für Tinnitus angesehen wird (Arnold et al., 1996; Lockwood et al., 1998; Andersson et al., 2000). Man kann daher davon ausgehen, dass die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Salicylatdosis bei den untersuchten Wüstenrennmäusen Tinnitus ausgelöst hat.

Neben den ototoxischen Effekten des Salicylats auf die Cochlea wurden verschiedene direkte Einflüsse des Salicylats auf Neurone des zentralen Nervensystems diskutiert. Kenmochi und Eggermont (1997) postulierten einen direkten Effekt des Salicylats auf Neurone des zentralen Nervensystems, der sich in einer Erniedrigung der Spindle-Frequenz im auditorischen Cortex von Katzen äußern soll. Die dargestellten Effekte sind jedoch zum einen sehr schwach, zum anderen wurden in dieser Studie keine direkten Effekte des Salicylats auf einzelne Neurone untersucht, sondern die Veränderung lokaler Feldpotentiale im AC bestimmt. Daher können die beobachteten Effekte ebenso gut eine Reaktion des zentralen auditorischen Systems auf den Hörschaden sein, ein Effekt der in Kapitel 4.4 im Detail diskutiert wird. Als weiterer direkter Einfluss des Salicylats auf Neurone des zentralen Nervensystems kann die Hemmung der Cyclooxygenase diskutiert werden (Vane, 1971; Vane und Botting, 1998). Dieses Enzym reguliert die Umsetzung von

Arachidonsäure in Prostaglandine (Vane et al., 1998). Eine Hemmung dieses Enzyms durch Salicylat führt daher zu einer Akkumulation der Arachidonsäure (Lüllmann et al., 1996), die erwiesenermaßen NMDA-Rezeptorströme potenzieren kann (Miller et al., 1992; Horimoto et al., 1996; Casado und Ascher et al., 1998; Richards et al. 2003). Da die Expression der IEGs *arg3.1* und *c-fos* über die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren induziert wird, könnte Salicylat über die Akkumulation der Arachidonsäure einen direkten Einfluss auf die Bildung des c-Fos und des Arg3.1-Proteins ausgeübt haben. Gegen diese Annahme spricht jedoch die Tatsache, dass Arg3.1- und c-Fos-Neurone in der vorliegenden Arbeit nach Salicylatinjektion nicht gleichmäßig verteilt in allen Hirnregionen gefunden werden, sondern eine sehr spezifische Verteilung vor allem im AC und in der zentralen Amygdala aufweisen (siehe 4.2). Gleichzeitig stimmt die Verteilung der c-Fos-Neurone nach Salicylatinjektion mit der Verteilung dieser Neurone nach einem Schalltrauma überein (Wallhäusser-Franke et al., 2003).

Neben den bisher genannten Wirkungen des Salicylats ist weiterhin bekannt, dass Salicylat bereits in therapeutischen Dosen zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt, die in einem erhöhten O₂-Verbrauch und dem Anstieg der CO₂-Produktion resultiert. Es kommt zu einer Erregung des Atemzentrums und CO₂ wird vermehrt abgeatmet. Im Bereich hoher Dosen stimulieren Salicylate das Atemzentrum vermehrt direkt (Forth et al., 1992). Die erhöhte Atmungsrate bedeutet physiologischen Stress für das Versuchstier und beeinflusst eventuell die beobachtete Aktivierung der Amygdala (siehe 4.3 und 4.6).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass Salicylat bei den Versuchstieren mit größter Wahrscheinlichkeit zu einer Wahrnehmung von Tinnitus geführt hat und dass die Arg3.1 und c-Fos-Bildung im auditorischen System auf die ototoxische Wirkung des Salicylats und den damit einhergehenden Hörschaden zurückgeführt werden kann.

4.1.2 Immunhistochemischer Nachweis der neuronalen Plastizitätsmarker Arg3.1 und c-Fos

Arg3.1 und *c-fos* gehören beide zur Gruppe der „immediate-early genes“ (IEG). Ihre Expression wird durch eine synaptische Aktivierung ausgelöst und benötigt keine Expression anderer Gene. *C-fos* gehört zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren und wird nach seiner Synthese in den Zellkern transportiert, um dort die Expression anderer, nachgeschalteter Gene zu regulieren. *Arg3.1* gehört zur Gruppe der Effektorgene. Die Proteinprodukte der Effektorgene sind direkt an strukturellen Veränderungen von Nervenzellen beteiligt (siehe auch 1.4).

In der vorliegenden Arbeit gab es unabhängig von der Behandlungsgruppe im Gyrus cinguli (CG) und im AC wesentlich mehr c-Fos- als Arg3.1-Neurone. In der Amygdala lagen nur nach Salicylatinjektion mehr c-Fos-Neurone vor. Die unterschiedliche Menge an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen kann nicht auf den gewählten Zeitpunkt für die Perfusion zurückgeführt werden. Es wurde gezeigt, dass die Arg3.1-Bildung drei bis vier Stunden nach künstlich induzierten epileptischen Anfällen maximal ist (Lyford et al., 1995). Die Wirkung des Salicylats hat sich nach zwei Stunden vollständig entfaltet (Müller et al., 2003; Biens, 1999). Dementsprechend wurden die Tiere fünf Stunden nach Salicylatbehandlung und drei Stunden nach akustischer Stimulation perfundiert. Die c-Fos-Bildung war drei bis vier Stunden nach Salicylatgabe maximal. Dieser Zeitpunkt wurde demnach um eine Stunde überschritten. Dennoch führte die Salicylatgabe zu einer mit früheren Experimenten übereinstimmenden Verteilung der c-Fos-Neurone (Oliva, 1997; Wallhäusser-Franke et al., 1997; Weller et al., 1998; Wallhäusser-Franke et al., 2003).

Die starke Expression von *c-fos* nach neuen sensorischen Reizen und die Tatsache, dass eine Blockade der c-Fos Produktion die Gedächtnisbildung unterdrückt, haben zu der Vorstellung geführt, dass der Nachweis von c-Fos benutzt werden kann, um plastische Veränderungen als Antwort auf sensorische Reize zu untersuchen (Tischmeyer und Grimm, 1999; Fleischmann et al., 2003). Im Moment ist jedoch nicht klar, welche Art der plastischen Veränderungen durch c-Fos beeinflusst werden. Als Transkriptionsfaktor steht die Expression von *c-fos* am Anfang einer Kette von Ereignissen, die am Ende in plastischen Veränderungen resultieren können. Im Gegensatz zu *c-fos* gehört *arg3.1* zur Gruppe der Effektorgene (Lanahan und Worley, 1998; Kuhl, 2000). Ein Teil der *arg3.1*-mRNA wird direkt in die Dendriten transportiert und akkumuliert in der Nähe von aktivierten Synapsen (Link et al., 1995; Steward und Worley, 2001b). Dieser Prozess ist

NMDA-Rezeptor-abhängig und kann über die Zugabe von NMDA-Rezeptor-Antagonisten blockiert werden (Steward und Worley, 2001a). Eine lokale Akkumulation des Arg3.1-Proteins in den Dendriten ist mit der Lokalisation der *arg3.1*-mRNA assoziiert. Neben den Dendriten wurde eine lokale Akkumulation des Arg3.1-Proteins auch in Zellkernen aktivierter Neurone beobachtet (Steward and Worley, 2001b). Welche Rolle das Arg3.1-Protein im Zellkern spielt ist jedoch bisher nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Arg3.1-Protein in einigen Tieren auch in den Dendriten nachgewiesen. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen konnten jedoch nur für die Markierung des Zellkerns gezeigt werden. Der zielgerichtete Transport der mRNA und die Bildung des Arg3.1-Proteins in den Dendriten wird gewöhnlich im Hippocampus untersucht, in dem Zellkörper und Dendriten in verschiedenen, klar getrennten Schichten angeordnet sind (Steward und Worley, 2002). Die Tatsache, dass im Neocortex und der Amygdala eine solche Anordnung der Zellkörper und Dendriten in getrennten Schichten nicht vorhanden ist, könnte dazu beigetragen haben, dass in der vorliegenden Arbeit für das Arg3.1-Protein keine spezifischen Unterschiede in der Dendritenfärbung beobachtet werden konnten.

Die Expression von *arg3.1* wurde bisher fast ausschließlich für Strukturen des Vorderhirns beschrieben. In der vorliegenden Studie wurden wenige Arg3.1-Neurone im Colliculus inferior (IC) eines akustisch stimulierten Tieres entdeckt. In diesem Tier wurde auch eine besonders hohe Menge an c-Fos-Neuronen gefunden (siehe 4.2.2.1). Nach meinem Kenntnisstand haben nur Holstege et al. (2003) bisher eine *arg3.1*-Expression und Proteinbildung außerhalb des Vorderhirns beobachtet. In ihrer Arbeit wurde eine erhöhte *arg3.1*-Expression im Rückenmark von Tieren gefunden, die besonders starken schmerzhaften Reizen ausgesetzt wurden, während ein schwächerer Reiz keine *arg3.1*-Expression auslöste. Holstege et al. (2003) und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen die Vermutung nahe, dass Neurone außerhalb des Vorderhirns durchaus in der Lage sind Arg3.1 zu bilden, dafür aber eine besonders starke synaptische Aktivierung benötigen. Dass die Arg3.1-Bildung generell eine höhere Aktivierung benötigt, bestätigt sich auch darin, dass in der vorliegenden Arbeit immer wesentlich mehr c-Fos als Arg3.1-Neurone vorhanden waren und Arg3.1 nur in einer kleinen Untergruppe der c-Fos-Neurone gebildet wird (siehe 3.1, 3.4.4). Auch die Experimente von Bajo et al. (2003) zeigen, dass die Arg3.1-Bildung eine höhere Reizintensität benötigt. In diesen Untersuchungen präsentierte man Wüstenrennmäusen gepulste Sinustöne mit einer Frequenz von 1 bzw. 16 kHz für entweder 2, 10 oder 15 min in verschiedenen Intensitäten (50 oder 70 dB SPL). Dabei zeigte es sich, dass nur die längeren Stimulationen mit 70 dB zu einer Arg3.1-Bildung im

AC führten, während c-Fos-Neurone immer vorhanden waren und ihre Anzahl direkt mit der Intensität und der Stimulationsdauer korrelierten.

Der Befund, dass Arg3.1 nur in wenigen vermutlich besonders stark aktivierten Neuronen gebildet wurde und die Tatsache, dass Arg3.1 direkt an strukturellen Veränderungen der postsynaptischen Membran als Antwort auf eine anhaltende Erregung beteiligt sein soll, legen die Vermutung nahe, dass Arg3.1 der spezifischere Marker für plastische Veränderungen ist.

4.1.3 Lokalisation der *arg3.1*-mRNA über *in situ*-Hybridisierung

Im Gegensatz zur Immunhistochemie, mit der man Proteine nachweisen kann, zeigt die *in situ*-Hybridisierung die Lokalisation der mRNA. In der vorliegenden Arbeit kann es bei der Untersuchung der *arg3.1*-mRNA im Vergleich zur Verteilung des Arg3.1-Proteins zu einer wesentlich intensiveren Markierung. Dies erklärt sich vermutlich über die größere Menge der mRNA im Vergleich zum Protein. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylatinjektion, mit der Lokalisation des Arg3.1-Proteins übereinstimmt. In Einklang mit der Literatur wurde nach Salicylat- und Salinebehandlung eine lokale Akkumulation der *arg3.1*-mRNA in den Schichten II, III, IV und VI des Cortex gefunden (Link et al., 1995). Zudem zeigte die Kontrollhybridisierung mit der *sense*-Sonde erwartungsgemäß, mit Ausnahme des Hippokampus, keine spezifische Markierung. Im Hippokampus wurde die spezifische Markierung in den Schichten gefunden, in denen die Somata der Neurone lokalisiert sind. Es ist bekannt, dass der Hippokampus an vielen gedächtnisbildenden Verarbeitungsprozessen im Gehirn beteiligt ist und diese Prozesse mit der Expression vieler verschiedener Gene einhergeht (z.B. Kandel, 2001; Silva, 2003). Dementsprechend bieten sich für die *sense*-Sonde sehr viele unspezifische RNA-Bindungspartnern. Dieser Effekt wird vermutlich über die hohe Konzentration an Somata in diesen Schichten noch verstärkt.

Leider konnten für den AC in der vorliegenden Arbeit zwischen den salicylat- und salinebehandelten Tieren keine überzeugenden Unterschiede in der Intensität der Markierung gefunden werden. Erwartungsgemäß sollte die *arg3.1*-Expression in Saline behandelten Tieren niedriger sein als in salicylatbehandelten Tieren. Von insgesamt sechs Tieren wurden jeweils drei Tiere gleichzeitig behandelt, zwei mit Salicylat und eines mit

Saline. Die Ergebnisse variierten zwischen den beiden Dreiergruppen, in der ersten Gruppe war die *arg3.1*-Markierung nach Salicylatbehandlung wesentlich intensiver, als nach Salinebehandlung, in der zweiten Gruppe konnte zwischen den Behandlungen kein Unterschied festgestellt werden. Dennoch zeichneten sich Tendenzen in der Lokalisation der *arg3.1*-mRNA ab. Während die *arg3.1*-mRNA, wie auch das Arg3.1-Protein, nach Salicylatinjektion vermehrt im hochfrequenten Bereich, an der Grenze zwischen AI und AAF gefunden wurde, lag die *arg3.1*-mRNA nach Salinebehandlung meist in anderen, tieffrequenteren Bereichen vor (siehe Abb. 3.15). Die Lokalisation der *arg3.1*-mRNA würde somit der Lokalisation des Arg3.1-Proteins nach Salicylatinjektion entsprechen (3.1.2). Die Tatsache, dass teilweise auch die salinebehandelten Tiere eine erhöhte Menge an *arg3.1*-mRNA aufwiesen kann vermutlich über eine unspezifische akustische Stimulation dieser Tiere zurückgeführt werden. Durch die höhere Sensitivität der radioaktiven *in situ*-Hybridisierung könnten somit bereits niedrige Reizintensitäten zu einer Markierung im AC führen, während die Lokalisation des Arg3.1-Proteins im Zellkern vermutlich eine höhere Reizintensität benötigt.

Im Gegensatz zum AC waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen für die zentrale Amygdala (CeA) sehr deutlich. Dementsprechend zeigten alle salicylatbehandelten Tiere eine starke Expression von *arg3.1* in CeA, während nach Salinebehandlung in dieser Struktur keine erhöhte *arg3.1*-Expression beobachtet wurde. Die erhöhte Lokalisation der *arg3.1*-mRNA nach Salicylatinjektion, stimmt somit mit der erhöhten Menge an Arg3.1-Protein in CeA überein und wurde vermutlich über stressrelevante Effekte ausgelöst (siehe 4.5).

Da die *in situ*-Hybridisierung ausserhalb unseres Labors durchgeführt wurde, konnten die Experimente bisher leider nicht wiederholt werden. Trotz der nicht ganz eindeutigen Befunde zur *arg3.1*-Expression im AC zeigen die Ergebnisse, dass eine erhöhte Expression von *arg3.1* mit einer erhöhten Menge des Arg3.1-Proteins im Zellkern einhergeht (siehe auch 4.1.2), ein Effekt der auch für den Hippocampus nach synaptischer Aktivierung beschrieben wurde (Steward and Worley, 2001b).

4.1.4 Charakterisierung der Arg3.1-Neurone über Fluoreszenz-Doppelfärbungen

Über die Fluoreszenz-Doppelfärbungen erfolgte eine nähere Charakterisierung der Arg3.1-Neurone. Für den Neocortex sind zwei Gruppen von Neuronen beschrieben, die Pyramiden- und die Sternzellen. Pyramidenzellen bilden mit einem Anteil von ca. 75% die weitaus größere Gruppe. Sie zeichnen sich durch ihre ausgeprägten Apikal- und Basaldendriten aus. Pyramidenzellen können lokal verschaltet sein, bilden aber häufig über ihre langen Axone Projektionen in andere corticale sowie in subcortical Gebiete. Sternzellen sind kleinere Neurone (Durchmesser $< 10 \mu\text{m}$), die lokal verschaltet sind und daher auch als Interneurone bezeichnet werden. Für die Arg3.1-Neurone wurde ein Zellkerndurchmesser von 11-13 μm bestimmt. Man kann daher davon ausgehen, dass Arg3.1 in Pyramidenzellen und nicht in Interneuronen gebildet wird. Da die Inhibition im Neocortex hauptsächlich über GABAerge-Neurone (γ -Amino-Buttersäure) vermittelt wird (Krnjevic, 1997) und Arg3.1 nie mit GABA kolokalisiert war, kann man davon ausgehen, dass Arg3.1 im Cortex in exzitatorischen Pyramidenzellen gebildet wird. Übereinstimmend fanden Vazdarjanova et al. (2003) Arg3.1 nach verhaltensrelevanten Situationen nur in erregenden hippocampalen und corticalen Neuronen. Leider kann in der vorliegenden Arbeit keine Aussage über die Kolokalisation von Arg3.1 und GABA in der Amygdala gemacht werden, da die GABA-Markierung in dieser Region aus den in Kapitel 3.4.3 genannten Gründen nicht funktioniert hat. Nach Salicylatinjektion zeigte sich, dass alle Arg3.1-Neurone gleichzeitig auch c-Fos synthetisieren. Eine Kolokalisation von Arg3.1 und c-Fos in denselben Neuronen wurde auch von Holstege et al. (2003) beschrieben. Laut Staiger et al. (2002) wird c-Fos im somatosensorischen Cortex von Ratten, die eine neue Umgebung erkundet hatten, hauptsächlich in exzitatorischen Pyramidenzellen und nur zu einem geringeren Anteil auch in inhibitorischen Neuronen gefunden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Arg3.1 im Cortex nach Salicylatinjektion in einer Untergruppe c-Fos bildender exzitatorischer Pyramidenzellen synthetisiert wird.

4.2 Arg3.1 und c-Fos im auditorischen System

4.2.1 Arg3.1 und c-Fos im auditorischen Cortex

Für die Mongolische Wüstenrennmaus wurden elektrophysiologisch (Thomas et al., 1993) und mit Hilfe der 2-Deoxyglucose-Methode (2-DG; Scheich et al., 1993) im Cortex mehrere auditorische Felder bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung des Arg3.1 und des c-Fos-Proteins in den primären auditorischen Feldern AI und AAF untersucht, die beide eine tonotope Organisation besitzen. In AI sind tiefe Frequenzen caudal und hohe Frequenzen rostral repräsentiert, während die Tonotopie in AAF genau spiegelbildlich zu AI ist. Gleichzeitig findet man im Cortex so genannte Isofrequenz-Banden, die sich von lateral nach medial über alle corticalen Schichten erstrecken und in denen Neurone mit gleicher Bestfrequenz lokalisiert sind (siehe auch 1.1.1).

4.2.1.1 Arg3.1 und c-Fos nach akustischer Stimulation

Nach akustischer Stimulation kam es zur Bildung des Arg3.1-Proteins in Neuronen des auditorischen Cortex, während in subcorticalen Gebieten abgesehen von einer Ausnahme (siehe 4.2.2) keine Arg3.1-Neurone gefunden wurden. Im AC waren Orte maximaler Arg3.1-Immunoreaktivität in den primären Feldern AI und AAF zu finden. Dabei lag eine dieser Maxima immer in AI das andere in AAF. Obwohl die Lage der Maxima zwischen den Hemisphären auch innerhalb eines Gehirns variierte, war der Abstand zwischen den Maxima in AI und AAF immer annähernd gleich und entsprach den beschriebenen tonotopen Gradienten in AI und AAF. Entsprechend war der Abstand zwischen den Maxima größer nach einer Stimulation mit einem schmalbandigen Rauschen zentriert um 1 kHz (NBW-1 kHz) und kleiner nach der Stimulation mit NBW-8 kHz. Die Variationen in der Lage der Maxima zwischen den Hemisphären könnten auf die individuellen Unterschiede in der Mikrostruktur des AC der Wüstenrennmaus zurückgeführt werden. In Experimenten, in denen die Lokalisation der Isofrequenz-Banden nach akustischer Stimulation mit Hilfe der 2-DG-Methode untersucht wurde, fanden Scheich et al. (1993) ähnlich starke Abweichungen zwischen Individuen, aber auch zwischen den beiden Hemisphären eines Individuums. Die 2-DG-Methode zeigt über die Akkumulation radioaktiv markierter Glukose die synaptische Aktivität von Neuronen. Scheich et al.

(1993) zeigten, dass die Isofrequenz-Banden in AI in dorso-ventraler Ausbreitung nach caudal hin, bis zu einem Winkel von 45° abknicken. Der Beginn dieses „Knicks“ kann zwischen den Hemisphären eines Individuums stark variieren. In AAF kommt es zu zusätzlichen Abweichungen, da AAF kleiner ist als AI und somit auch die räumliche Auslösung der Frequenzen in diesem Feld schlechter ist. Dieser Effekt scheint besonders ausgeprägt, wenn man sich die Position der Isofrequenz-Banden in AAF in Relation zur Hippocampus-Referenzlinie (HRL) in AI betrachtet (Scheich et al., 1993). Ein weiterer Faktor, der zu den beobachteten symmetrischen Verschiebung der Maxima zwischen den Hemisphären geführt haben könnte, ist die Konstruktion der HRL. In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden rostralen Pole des Hippocampus miteinander verbunden und diese Linie über den Cortex hinaus verlängert. Leichte Variationen in der rostro-caudalen Lage der rostralen Pole der beiden Hippocampi könnten somit ebenfalls zu den beobachteten Verschiebungen der Maxima in Relation zur HRL geführt haben.

Im Gegensatz zu der fokussierten Arg3.1-Bildung kamen c-Fos bildende Neurone wesentlich häufiger vor und lagen über breitere Frequenzbereiche verteilt vor. In Einklang mit diesem Befund fanden Zuschratter et al. (1995) eine hohe Anzahl und eine breite Verteilung der c-Fos-Neurone, wenn sie einen in seiner Frequenz modulierten Ton (900-1000 Hz) mehrfach präsentierten, während eine kürzere Präsentation (3x) zu einer fokussierten c-Fos-Bildung führte. In zwei der akustisch stimulierten Tiere (1x NBW- 1 kHz; 1 x NBW-8 kHz) wurden keine Arg3.1-Neurone entdeckt, während die c-Fos-Neurone in Frequenzbereichen lokalisiert waren, die mit der Tonotopie in AI und AAF übereinstimmten. Die Anzahl der c-Fos-Neurone war in diesen Tieren wesentlich geringer als bei den anderen NBW-stimulierten Tieren. Dies weist auf eine geringere Aktivierung im AC dieser Tiere hin. Entsprechend wurden in diesen Tieren auch im VCN weniger c-Fos-Neurone gefunden. Da die Stimuluspräsentation während der Versuche genau überwacht wurde (siehe 2.2.1), kann davon ausgegangen werden, dass die geringere Aktivierung des auditorischen Systems dieser Tiere nicht auf eine fehlerhafte Stimuluspräsentation zurückzuführen ist. Die Hörschwellen der Wüstenrennmäuse wurden vor den Experimenten nicht bestimmt, da in der vorliegenden Arbeit unspezifische Nebeneffekte durch die Narkose und die dann notwendig werdende zusätzliche Behandlung vermieden werden sollten. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass diese beiden Tiere von vornherein ein geringeres Hörvermögen hatten. Weiterhin könnten Unterschiede im Erregtheitsgrad und damit in der Aufmerksamkeit der Tiere zu den beobachteten Unterschieden geführt haben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass akustische Stimulationen mit einer hohen Intensität zu Arg3.1-abhängigen plastischen Veränderungen im AC führen können, und dass diese Veränderungen meist in Bereichen vorkommen, in denen Neurone lokalisiert sind, die am besten auf die im Stimulus enthaltenen Frequenzen antworten. Die Arg3.1-Proteinbildung erfolgt somit in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz und steht in Einklang mit der Tonotopie im AC.

4.2.1.2 *Arg3.1 und c-Fos nach Salicylatinjektion*

Insgesamt wurden 24 Tiere (6x Gruppe 2; 3x Gruppe 4; 4x Gruppe 6; 11x Gruppe 10) auf die Bildung des Arg3.1 und c-Fos-Proteins nach einer einmaligen Salicylatinjektion in einer Konzentration von 350 mg/kg untersucht. 21 Tiere zeigten distinkte Maxima, die im hochfrequenten Bereich an der Grenze zwischen AI und AAF lokalisiert waren. In wenigen Tieren wurden zusätzliche Maxima im tieffrequenten Bereich von AI und noch seltener rostral in AAF gefunden. Nur ein Tier zeigte eine völlig abweichende Verteilung der Neurone (Gruppe 2). In den Tieren der Gruppen 1-3 wurde die Lokalisation des Arg3.1-Proteins im Detail untersucht. Es zeigte sich, dass Arg3.1-Neurone im Vergleich zur akustischen Stimulation und Salinebehandlung nach Salicylatinjektion signifikant häufiger an der Grenze zwischen AI und AAF vorlagen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen, die mit Hilfe der 2-DG-Methode eine erhöhte Aktivität in AI und AAF nach Salicylatinjektion zeigten (Wallhäusser-Franke et al., 1996). In diesen Experimenten wurde immer eine erhöhte Aktivität in zwei bis drei Isofrequenz-Banden des AI gefunden. Diese Banden wurden an unterschiedlichen rostro-caudalen Positionen gefunden und zeigten unterschiedliche dorso-ventrale Ausbreitungen. Eine dieser Banden lag jedoch immer im hochfrequenten Bereich von AI. In der vorliegenden Arbeit kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob die Maxima im hochfrequenten Bereich in AI oder in AAF lokalisiert waren. salicylatbehandelte Tiere der Gruppe 2 (Versuchsreihe 1), in denen die Lage der Maxima näher bestimmt wurde (Abb. 3.4), zeigten dass diese zum Teil in AI und zum Teil in AAF lokalisiert waren. In Tieren der Gruppe 4 traten die Maxima etwas weiter caudal auf und waren damit deutlich in AI lokalisiert. Thomas et al. (1993) zeigten, dass am Übergang von AI zu AAF gelegentlich Neurone zu finden sind, die auf große Frequenzbereiche (4-5 Oktaven) gleich gut antworten und eine kurze Latenz zeigen (10-15 ms). Eine breite Abstimmung der Neurone

findet man häufig in auditorischen Strukturen der extralemniscalen nicht tonotopen Hörbahn. Verschiedene Autoren haben über Veränderungen in Strukturen der extralemniscalen Hörbahn nach tinnitusauslösenden Behandlungen berichtet. So wurden z.B. Veränderungen im externen Nucleus des IC (Chen und Jastreboff, 1995) und in sekundär auditorischen Gebieten des Cortex (Eggermont und Kenmochi, 1998) beobachtet. Es könnte somit sein, dass die „*wide-band*“-Neurone an der Grenze zwischen AI und AAF nicht den primär auditorischen Gebieten zuzuordnen sind, sondern ein eigenes sekundär auditorisches Feld bilden. Eine Untersuchung der Verbindungen dieser Neurone mit anderen Gebieten könnte zeigen, ob „*wide-band*“-Neurone primär, oder sekundär auditorisch sind. Nach meiner Kenntnis sind solche Untersuchungen jedoch bisher nicht durchgeführt worden.

Eine Reihe von Gründen legen nahe, dass Arg3.1 in Neuronen gebildet wird, die besonders gut auf hohe Frequenzen antworten. Zum einen lagen die Maxima der Arg3.1-Neurone nach Salicylatinjektion nicht immer an der Grenze zwischen AI und AAF, sondern wurden in manchen Tieren auch in anderen Bereichen von AI und AAF gefunden (siehe Abb. 3.4). Zum anderen sollte die stärkste Aktivierung des AC nach dem bestehenden Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus in Frequenzbereichen auftreten, in denen auch der größte Hörschaden vorliegt (Langner und Wallhäuser-Franke et al., 1999; Wallhäuser-Franke und Langner, 2001; siehe auch 1.3.3 und 4.6). Müller et al. (2003) zeigten, dass der durch Salicylat verursachte Hörschaden verstärkt die hohen Frequenzen (8-32 kHz) betrifft. Zudem ist bekannt, dass die Gabe von Salicylat in hohen Konzentrationen bei Nagern (Brennan und Jastreboff, 1991) und bei Menschen (Cazals, 2000) zu einem hochfrequenten Höreindruck führt.

Vergleichbar mit den akustischen Stimulationen kamen c-Fos bildende Neurone in salicylatbehandelten Tieren sehr viel häufiger vor und waren über weite Frequenzbereiche verteilt. Im Gegensatz zu den Arg3.1-Neuronen, die in allen Schichten nahezu gleichmäßig verteilt vorlagen, zeigten die c-Fos-Neurone ein lokales Maximum in den Schichten III und IV des AC, ein Befund der mit früheren Untersuchungen in Einklang steht (Wallhäuser-Franke et al., 2003). Die Tatsache, dass c-Fos-Neurone über breite Bereiche verteilt vorkamen, zeigt dass nach Salicylatinjektion viele Neurone im AC aktiviert werden. Zudem weist die starke c-Fos-Bildung in Schicht III und IV auf eine Aktivierung der corticalen Neurone über die aufsteigende Bahnen aus dem auditorischen Thalamus hin (siehe 4.4). Im Gegensatz dazu finden Arg3.1-abhängige plastische Veränderungen nur in wenigen, meist im hochfrequenten Bereich des AC lokalisierten Neuronen statt und

betreffen anscheinend alle corticalen Schichten. Es ist anzunehmen, dass die Arg3.1-abhängigen plastischen Veränderungen im hochfrequenten Bereich des AC mit der Wahrnehmung eines hochfrequenten Tinnitus einhergehen, und dass diese plastischen Veränderungen an der Stabilisierung eines hochfrequenten Tinnitussignals beteiligt sind.

4.2.1.3 Arg3.1 und c-Fos nach Salineinjektion

Nach Salineinjektionen kam es zu unterschiedlichen Resultaten in Tieren der Gruppen 3 und 5. Tiere der Gruppe 3 zeigten eine erhöhte Menge an Arg3.1 und c-Fos-Neuronen im AC. Da dieser Befund früheren Ergebnissen widersprach (Wallhäusser-Franke et al., 2003), wurden die Versuche zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt (Gruppe 5). In Tieren der Gruppe 5 wurden, in Einklang mit früheren Ergebnissen, keine Arg3.1 und nur wenige c-Fos-Neurone im AC gefunden. Diese Unterschiede können auf die relativ unkontrollierte akustische Umgebung während der Versuche zurückgeführt werden. Um Stresseinflüsse durch eine neue Umgebung zu vermeiden, blieben die Tiere zwischen Injektion und Perfusion in ihrer gewohnten, akustisch unkontrollierten Umgebung. Die erhöhte Arg3.1 und c-Fos-Bildung in Tieren der Gruppe 3 wurde daher durch die ungewöhnlich lauten Umgebungsgeräusche, verursacht durch eine Baustelle in der Nähe des Tierstalls, ausgelöst. Dementsprechend wurden in diesen Tieren auch vermehrt c-Fos bildende Neurone im VCN gefunden (siehe auch 4.2.2.2). Die Problematik der unkontrollierten akustischen Umgebung sollte in zukünftigen Experimenten unbedingt vermieden werden. Dies ist jedoch nicht ganz einfach, da eine schallisolierte Umgebung erwiesenermaßen auch in normalhörenden Individuen zur Wahrnehmung eines Tinnitus und damit zu einer Aktivierung des AC führen kann (Heller und Bergmann, 1953). Am sinnvollsten erscheint daher eine kontinuierliche akustische Stimulation in einer ansonsten schallisolierten Umgebung. Beispielsweise könnte man den Tieren ein alle Frequenzen umfassendes, weißes Rauschen in einer niedrigen Intensität vorspielen. Da die Tiere diese Geräuschen jedoch nicht als „neu“ empfinden dürfen und ihnen keine Aufmerksamkeit widmen sollten, ist eine Stimulation über längere Zeiträume für die Gewöhnung der Tiere an die Geräusche unbedingt notwendig.

4.2.2 Arg3.1 und c-Fos in subcorticalen auditorischen Gebieten

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (z.B. Link et al., 1995; Lyford et al., 1995; Pinaud et al., 2001; Waltereit, 2001) war die Arg3.1-Bildung generell auf das Vorderhirn beschränkt und wurde mit Ausnahme des IC eines akustisch stimulierten Tieres nie in subcorticalen Gebieten gefunden. Im IC dieses Tieres war die Anzahl an c-Fos-Neuronen ungefähr doppelt so hoch, wie in den anderen akustisch stimulierten Tieren. Wie auch von Holstege et al. (2003) gezeigt, kann eine ungewöhnlich hohe postsynaptische Aktivierung auch in subcorticalen Gebieten zu einer Bildung von Arg3.1 führen (siehe 4.1.2).

4.2.2.1 *Arg3.1 und c-Fos im Colliculus inferior*

Der Colliculus inferior (IC) ist die Hauptumschaltstelle auditorischer Informationen im Mittelhirn. Der IC der Wüstenrennmaus teilt sich funktionell und anatomisch in drei Untereinheiten auf, den zentralen IC (ICC), den dorsalen Cortex des IC (DCIC) und den externen Cortex des IC (ECIC) (Budinger et al., 2000b). Der ICC ist tonotop organisiert und erhält hauptsächlich Eingangsinformationen aus den auditorischen Hirnstammkernen, während in den anderen beiden Bereichen verstärkt die corticofugalen Rückprojektionen aus dem Thalamus und dem Cortex terminieren (Ehret und Romand, 1997; siehe auch 1.1.4.). Da kein Konsens über die Grenzen zwischen diesen Unterkernen besteht (siehe 1.1.3) und überdies die Grenzen in den hier verwendeten Horizontalschnitten schlecht zu erkennen sind, wurden in der vorliegenden Arbeit markierte Neurone aus allen drei Unterregionen zusammengekommen. Mit oben genannter Ausnahme wurden im IC keine Arg3.1-Neurone gefunden. Die Anzahl an c-Fos-Neuronen nach Salicylatinjektion war im Vergleich zu den akustisch stimulierten und salinebehandelten Tieren leicht erniedrigt und weist daher auf einen verminderten auditorischen Eingang hin. Obwohl die Grenzen zwischen den Unterkernen nicht klar erkennbar waren, wurden c-Fos-Neurone nach akustischer Stimulation tendenziell weiter zentral gefunden, während sie nach Salicylatinjektion eher in den peripheren Bereichen lokalisiert waren. Chen und Jastreboff (1995) berichten über eine erhöhte Spontanaktivität in den Neuronen des ECIC kurz nach Injektion einer hohen Dosis an Salicylat (350mg/kg) und diskutieren diese als ein mögliches Korrelat für Tinnitus. Da der ECIC vornehmlich über Rückprojektionen

innerviert wird, widerspräche ein solcher Befund nicht der Hypothese, dass die Tinnitusaktivität in den Strukturen des thalamocorticalen Systems entsteht. Danach wären die von Chen und Jastreboff (1995) beobachteten Effekte über die Aktivierung der corticofugalen Rückprojektionen zu erklären (siehe auch 4.7).

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit finden Wu et al. (2003) und Zhang et al. (2003) eine erhöhte Bildung des c-Fos-Proteins im ICC nach tinnitusauslösenden Behandlungen. Aufgrund der methodischen Unterschiede ist jedoch kein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich. Zhang et al. (2003) untersuchte die Bildung des c-Fos-Proteins 23 bis 40 Tage nach einem Schalltrauma und Wu et al. (2003) injizierten an fünf aufeinander folgenden Tagen eine mittlere Dosis an Salicylat (250 mg/kg) und untersuchten die c-Fos-Bildung 30 Stunden nach der letzten Injektion. Im Gegensatz dazu untersuchte ich die akuten Effekte nach einer einzelnen Salicylatinjektion. Guitton et al. (2003) demonstrierten, dass das Hörvermögen 24 Stunden nach der letzten von vier täglichen Salicylatinjektionen vollständig wieder hergestellt ist. Aus diesem Grund könnten Effekte, die 30 Stunden nach der letzten Injektion beobachtet werden auf ein wiederkehrendes Hörvermögen und eine erhöhte Sensitivität des Hörsystems verursacht durch den vorhergehenden Hörschaden zurückgeführt werden. Die Experimente von Wu et al. (2003) wurden in unserem Labor wiederholt (Scheel, 2003). Der einzige Unterschied zu den von Wu et al. (2003) publizierten Experimenten war der Zeitpunkt der Perfusion nach der letzten Salicylatinjektion, der in der Arbeit von Scheel (2003) nur 22 statt 30 Stunden betrug. In dieser Arbeit konnten zwischen Saline- und Salicylatbehandlung keine deutlichen Unterschiede in der Bildung von c-Fos im IC gefunden werden. Vermutlich kann die Diskrepanz zu Wu et al. (2003) darüber erklärt werden, dass nach 22 Stunden immer noch ein Hörschaden vorlag, während das Hörvermögen nach 30 Stunden bereits zurückkehrt. Generell erscheint es fragwürdig für die Untersuchung chronischer Effekte nach experimenteller Tinnitusauslösung die Expression eines „*immediate-early genes*“ (IEG) zu wählen, da IEGs bekanntermaßen kurz nach der Präsentation eines neuen Stimulus gebildet werden, ihre Expression aber nach anhaltender Aktivierung herunter geregelt wird (Kelly und Deadwyler, 2002; Mello et al., 1995).

Weiterhin scheint die Aktivität im IC generell sehr variabel zu sein und ist relativ unabhängig von einer Aktivierung des AC (Wallhäusser-Franke et al., 1996; Wallhäusser-Franke und Langner, 2001; Wallhäusser-Franke et al., 2003). Dementsprechend wurde auch in der vorliegenden Arbeit in Tieren, die nach akustischer Stimulation keine Arg3.1-

und nur wenig c-Fos-Neurone zeigten, eine mit den anderen Tieren dieser Gruppe vergleichbare Menge an c-Fos-Neuronen im IC gefunden.

4.2.2.2 *Arg3.1 und c-Fos im Nucleus Cochlearis*

Der Nucleus cochlearis (CN) wird aufgrund seiner heterogenen Zellstruktur in einen dorsalen (DCN) einen posterior ventralen CN (PVCN) und einen anterior ventralen CN (AVCN) unterteilt. Alle drei Unterkerne sind tonotop organisiert und werden über den Hörnerven innerviert (Ehret und Romand, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde nur der ventrale Kern des CN (VCN) untersucht. Dies lag zum einen an der begrenzten Anzahl an Schnitten, die simultan behandelt werden konnten (siehe 2.2.3), zum anderen wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass c-Fos im DCN nur nach einem Schalltrauma (Mahlke, 1999; Wallhäusser-Franke et al. 2003), nicht aber nach Salicylatinjektionen gebildet wird (Wallhäusser-Franke et al. 1997, 2003). Da die c-Fos-Bildung im VCN bekanntermaßen über akustischen Stimulationen ausgelöst werden kann (Ehret and Fischer, 1991; Friauf, 1992; Brown and Liu, 1995), diente die Untersuchung der c-Fos-Bildung im VCN in der vorliegenden Arbeit der Überprüfung der Eingangsaktivität aus der Cochlea. Entsprechend wurden c-Fos-Neurone im VCN in akustisch stimulierten und salinebehandelten Tieren der Gruppe 3, nicht aber in salicylatbehandelten Tieren gefunden.

Da salinebehandelte Tiere der Gruppe 3 und salicylatbehandelte Tiere der Gruppe 2 zu gleichen Zeiten behandelt wurden und nach der Behandlung in der gleichen akustischen Umgebung verblieben, weist die fehlende c-Fos-Bildung im VCN nach Salicylatinjektion auf das verminderte Hörvermögen dieser Tiere hin (siehe auch 4.2.1.3). Die Tonotopie im VCN ist nur in Transversalschnitten gut zu erkennen. Da für die vorliegende Arbeit jedoch wegen der Tonotopie im AC ausschließlich Horizontalschnitte verwendet wurden, konnten die c-Fos-Neurone im VCN nach akustischer Stimulation keinen bestimmten Frequenzbereichen zugeordnet werden.

4.3 Arg3.1 und c-Fos im limbischen System

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Gebiete des limbischen Systems näher untersucht, der Gyrus cinguli und die Amygdala. Die Amygdala ist wichtig für die emotionale Verarbeitung sensorischer Stimuli und für die Generierung angemessener Reaktionen auf solche Stimuli. Sie ist an der Gedächtnisbildung emotional relevanter Informationen und an der Regulation des Wachheitsgrades und der Aufmerksamkeit beteiligt (z.B. Holland and Gallagher, 1999; Cardinal et al., 2002; McGaugh, 2002; Le Doux, 2003). Über ihren lateralen Kern (LA) gelangen sensorische Informationen aus dem Thalamus und dem Cortex in die Amygdala, während der zentrale Teil der Amygdala (CeA) die Hauptausgangstruktur bildet (McDonald, 1998; Jolkonnen und Pitkänen, 1998; Budinger et al., 2000b; Woodson et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit führten nur Salicylatinjektionen zu einer stark erhöhten Anzahl an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen in CeA. Übereinstimmend lag auch die *arg3.1*-mRNA vermehrt in CeA vor. Wie schon im AC war die Anzahl an c-Fos-Neuronen in CeA wesentlich höher, als die Anzahl der Arg3.1-Neurone. In früheren Studien wurde gezeigt, dass es nach Tinnitusauslösung durch ein Schalltrauma ebenfalls zu einer Aktivierung der CeA kommt (Mahlke, 1999; Wallhäusser-Franke et al., 2003). Wir nehmen an, dass die Aktivierung der CeA auf den akuten Stress der salicylatbehandelten Tiere zurückzuführen ist. Als mögliche Stressoren kommen physiologische Veränderungen, die durch hohe Dosen an Salicylat hervorgerufen werden, der plötzliche Hörverlust und die Tinnitusaktivität selbst in Betracht (Wallhäusser-Franke et al., 2003). Neben den Projektionen in den Hirnstamm und den Hypothalamus projiziert die CeA in Strukturen, wie in das basale Vorderhirn, die die Verarbeitung sensorischer Reize im Thalamus und Cortex modulieren (Kapp et al., 1994; Han et al., 1999; Cain et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden Arg3.1-Neurone nach Salicylatinjektion vermehrt in der lateralen Untereinheit von CeA (CeL) gefunden. Jolkonnen et al. (2002) zeigten für die Ratte, dass CeL in den magnozellulären Bereich des basalen Vorderhirns projiziert, von dem aus cholinerge Projektionen in den Cortex ziehen. Stimuliert man die CeA elektrisch, kommt es im frontalen Cortex von Hasen zu einer Unterdrückung der „delta-wave“ (1-4 kHz) Aktivität, was auf einen Anstieg des Wachheitsgrads hindeutet. Dieser Effekt kann durch cholinerge Antagonisten blockiert werden (Kapp et al., 1994). Es wurde daher vorgeschlagen, dass CeA den Erregungszustand des Cortex über die cholinergen, aus dem basalen Vorderhirn stammenden Afferenzen modulieren kann. Entsprechend interessierte

mich die Frage, ob die Bildung von Arg3.1 und c-Fos im AC nach Salicylatinjektion über die Gabe des cholinergen Antagonisten Scopolamin unterdrückt werden kann. Es zeigte sich, dass im AC aller salicylatbehandelten Tiere, die zusätzlich Scopolamin injiziert bekommen hatten, keine Arg3.1 und vergleichsweise wenig c-Fos-Neurone vorhanden waren. In CeA hingegen, war die Anzahl der markierten Neuronen vergleichbar mit Tieren, die nur Salicylat injiziert bekommen hatten. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass die Expression der aktivitätsinduzierten Gene *arg3.1* und *c-fos* im AC nach Salicylatgabe über cholinerge Projektionen aus dem basalen Vorderhirn moduliert wird (siehe auch 4.6). Im Gegensatz dazu scheint die Bildung von Arg3.1 und c-Fos in CeA unabhängig von einer cholinergen Modulation zu sein.

Auch in der lateralen Amygdala (LA) wurde nur nach Salicylatinjektionen eine deutlich erhöhte Anzahl an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen gefunden. Dabei war die Menge an c-Fos-Neuronen wie in CeA, AC und CG wesentlich höher als die der Arg3.1-Neurone. Eine Aktivierung der LA über Projektionen aus dem auditorischen Thalamus (LeDoux et al., 1990; LeDoux und Farb, 1991; Woodson et al., 2000) oder direkt aus AI und AAF (Budinger et al., 2000a) kann ausgeschlossen werden, da in diesem Fall die erhöhte Aktivierung des AC in akustisch stimulierten Tieren auch zu einer erhöhten Proteinbildung in LA geführt haben müsste. Vermutlich hängt die Arg3.1- und c-Fos-Bildung in LA ebenfalls von stressbedingten Mechanismen ab, wie z.B. der Aktivierung der HPA-Achse (*hypothalamus-pituitary adrenocortical*). Es ist bekannt, dass die Aktivierung der CeA durch emotional erregende Ereignisse zu einer Aktivierung der HPA-Achse führt, die in einer erhöhten Menge an zirkulierendem Kortikosteron resultiert (Roosendaal et al., 1991). Roosendaal und McGaugh (1996) zeigten, dass die Bindung von Kortikosteronen an die in LA lokalisierten Glukokortikoid-Rezeptoren zu einer Verstärkung der Gedächtnisbildung führen kann. Im Gegensatz zu den Salicylatinjektionen wurden nach akustischer Stimulation und Salineinjektion beide Proteine gleich häufig gefunden. Die Menge an c-Fos-Neuronen nach Salineinjektionen war mit früheren Studien vergleichbar (Wallhäusser-Franke et al., 2003). Dies legt nahe, dass die geringe Menge an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen in LA nach akustischer Stimulation und Salinebehandlung dem Grundlevel der beiden IEGs in diesem Gebiet entsprechen könnte. Eine basale Expression beider IEGs wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (z.B. Dragunow und Faul, 1989; Lyford et al., 1995; Link et al., 1995).

Die zweite limbische Struktur, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wurde ist der Gyrus cinguli (CG2/3). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass der CG und die Amygdala

Teile eines Netzwerkes sind, welches emotional relevante Informationen integriert (Devinsky et al., 1995; Cardinal, 2002). Nach Posner und Rothbart (1998) ist der anteriore CG aktiv, wenn es darum geht, die Aufmerksamkeit auf einen bestimmten Stimulus zu fokussieren oder ablenkende Stimuli zu unterdrücken. In Einklang damit fanden Montag-Sallaz et al. (1999) eine erhöhte Menge an *arg3.1*-mRNA im CG von Mäusen, wenn diese einen neuen Geschmacksreiz präsentiert bekamen. In der vorliegenden Arbeit war die Anzahl der Arg3.1-Neurone in CG (2/3) in allen Behandlungsgruppen erhöht und korrelierte mit der Anzahl der Arg3.1-Neurone in AC. Es gab weder in der Anzahl noch in der Verteilung der markierten Neurone signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen. Die Anzahl an c-Fos-Neuronen war auch hier wesentlich höher als die Anzahl der Arg3.1-Neurone.

Die Ergebnisse für die Amygdala und den CG (2/3) zeigen deutliche Unterschiede. In CeA und LA kam es nach Salicylatinjektion zu einer, gegenüber den anderen Behandlungsgruppen, erhöhten Arg3.1- und c-Fos-Bildung. Im Gegensatz dazu hing die Bildung von Arg3.1 und c-Fos im CG nicht von der Behandlung ab, sondern variierte in Übereinstimmung mit der Anzahl der markierten Neurone im AC.

Die Tatsache, dass CG (2/3) in der Wüstenrennmaus über direkte Projektionen aus AI und AAF innerviert wird (Budinger et al., 2003) und die Anzahl der Neurone in beiden Gebieten korreliert erschien, legt nahe, dass die Aktivierung im AC einen direkten Einfluss auf die Aktivierung im CG hat. Darüber hinaus sollte sowohl die akustische Stimulation, als auch die Wahrnehmung des Tinnitus einen neuen unbekannten auditorischen Reiz darstellen, der mit einer Aktivierung des CG einhergehen könnte. Die starke Aktivierung der Amygdala nach Salicylatinjektion kann jedoch nicht ausschließlich über die Aktivierung des AC erklärt werden. Vielmehr scheint die Amygdala über andere, höchstwahrscheinlich stressbedingte Einflüsse stimuliert zu werden (siehe auch 4.7).

4.4 Salicylatbedingte Aktivierung des thalamocorticalen Systems

Als physiologisches Korrelat für Tinnitus wird eine anhaltende corticale Aktivierung angesehen, die nicht durch eine auditorische Stimulation verursacht wird (Arnold et al., 1996; Lockwood et al., 1998; Langner und Wallhäusser-Franke, 1999; Andersson et al., 2000; Wallhäusser-Franke und Langner, 2001). In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen kam es in der vorliegenden Arbeit nach Salicylatgabe zu einer Aktivierung und zur Expression plastizitätsrelevanter Gene im auditorischen Cortex (AC) der Wüstenrennmaus, während die Eingangsaktivität bis hin zum Colliculus inferior (IC) in denselben Tieren unterdrückt war (Wallhäusser-Franke et al., 1996; Wallhäusser-Franke et al., 2003). Der verminderte Eingang bis zum IC lässt darauf schließen, dass die frühen Veränderungen nach Tinnitusinduktion vornehmlich das thalamocorticale System betreffen. Ausgeprägte thalamocorticale Verbindungen sind für alle Sinnesmodalitäten bekannt und man nimmt an, dass die Frequenz der oszillierenden Aktivität in diesem System mit dem Wachheitsgrad und der Qualität der Wahrnehmung eines Reizes in Zusammenhang stehen (Steriade et al., 2000). Das auditorische thalamocorticale System beinhaltet den auditorischen Thalamuskern MGB (medialer Kniekörper), den AC und den caudalen Teil der Formatio reticularis (Rouiller und Welker, 1991). Cotillon et al. (2000) haben gezeigt, dass es nach der Präsentation akustischer Stimuli in diesen Strukturen zu Oszillationen in einem Frequenzbereich zwischen 5-14 Hz kommt, während das visuelle System auf einen Reiz mit Oszillationen in einer wesentlich höheren Frequenz antwortet (25-90 Hz; γ -Oszillationen). Interessanterweise führt eine Verminderung des sensorischen Eingangs, wie es zum Beispiel für den Übergang in die Tiefschlafphase der Fall ist, zu einem rhythmischen Feuern (*rhythmic burst firing*) der Neurone des thalamocorticalen Systems. Steriade (2000) schlägt vor, dass das Gehirn während des Tiefschlafs komplett von der Außenwelt abgekoppelt ist und nur intern generierte Aktivität stattfindet. Dabei kommt es in den Neuronen des Neocortex in bestimmten Abständen zu Phasen verstärkter Erregbarkeit. Anhaltende rhythmische Feuersalven in Neuronen des Cortex und Thalamus führen zu kurzzeitigen plastischen Veränderungen während der Tiefschlafphase. Diese Änderungen könnten dazu dienen, Erinnerungsspuren zu festigen, die in der Wachphase angelegt wurden. Jeanmonod et al. (1996) konnten solche rhythmischen Entladungen im Thalamus von Tinnituspatienten und Patienten mit chronischen Schmerzen nachweisen. C-Fos-Neurone zeigten in der vorliegenden Arbeit immer ein lokales Maximum in Schicht III und IV des auditorischen Cortex. Diese Schichten bilden die Haupteingangsschicht aus

dem ventralen tonotopen Teil des MGB (vMGB). Von dort wird die Information an Schicht II und III und dann an Neurone in Schicht V und VI weitergeleitet, die dann zurück in den vMGB projizieren (Ehret und Romand, 1997; siehe auch Abb 4.1). Die ausgeprägte c-Fos-Markierung in den Schichten III und IV weist dementsprechend auf eine starke Aktivierung aus dem auditorischen Thalamus hin. In Übereinstimmung mit dieser Annahme wurde auch in Experimenten mit der 2-DG-Methode, die verstärkt die präsynaptische Aktivierung anzeigt, eine starke Markierung der corticalen Schichten III und IV gefunden (Wallhäusser-Franke et al., 1996). Der vMGB wurde in der vorliegenden Arbeit nicht gesondert betrachtet. In den vorhandenen Schnitten und in früheren Untersuchungen (Wallhäusser-Franke et al., 2003) konnte jedoch im vMGB keine deutliche c-Fos-Markierung gefunden werden. Allerdings wurden c-Fos-Neurone nach tinnitusauslösender Behandlung in den ventral des MGB gelegenen thalamischen Kernen PIL und PP gefunden (Wallhäusser-Franke et al., 2003). Diese Kerne projizieren in den AC und beeinflussen dort vermutlich die oszillatorische Aktivität (Barth und MacDonald, 1996; Sukov und Barth, 2001). Die Tatsache, dass im vMGB keine c-Fos-Neurone beobachtet wurden, könnte darauf hinweisen, dass die Neurone des vMGB auf erregende Eingänge generell weniger plastisch reagieren. Dementsprechend ist das Antwortverhalten der Neurone des vMGB bei auditorischen Lernexperimenten sehr konstant (Gabriel et al., 1975) und eine Blockade der Proteinsynthese in der Amygdala nicht aber im MGB kann die Konsolidierung einer Pavlovschen Konditionierung unterdrücken. Es erscheint daher sinnvoll die Aktivität im vMGB in zukünftigen Untersuchungen mit reinen Aktivitätsmarkern, wie der 2-DG-Methode zu untersuchen.

Zusammenfassend kann man annehmen, dass der durch Salicylat verminderte auditorische Eingang und die damit einhergehende funktionelle Deafferentierung zu einem rhythmischen Feuern der Neurone des thalamocorticalen Systems führt. Solch eine Aktivierung könnte als Tinnitus wahrgenommen werden. Ein solcher Prozess wäre sehr schnell und würde zunächst keine plastischen Veränderungen benötigen. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Touma (1992), der beim Menschen eine sehr schnelle Entstehung von Tinnitus nach einem Schalltrauma beobachtete. Ist der auditorische Eingang jedoch längerfristig vermindert, kommt es zu einer andauernden rhythmischen Aktivität, die unter dem Einfluss modulierender Systeme des Hirnstamms und des basalen Vorderhirns (Edeline, 2003; Weinberger, 2003) zu plastischen Veränderungen im thalamocorticalen System und damit zu einer Stabilisierung der Tinnitusaktivität führen könnte.

4.5 Plastische Veränderungen im auditorischen Cortex nach Salicylatinjektion und akustischer Stimulation

Arg3.1 und c-Fos sind beide an reizinduzierten plastischen Veränderungen von Nervenzellen beteiligt. Während Arg3.1 vermutlich direkt an strukturellen Veränderungen der postsynaptischen Membran beteiligt ist, ist die Rolle von c-Fos nicht vollständig geklärt (siehe 1.4 und 4.1.2). Generell wurden nach allen Behandlungen sehr viel mehr c-Fos- als Arg3.1-Neurone gefunden. Zudem lagen c-Fos-Neurone in fast allen Frequenzbereichen vor, während Arg3.1-Neurone nur in definierten Bereichen des AC gefunden wurden. Die Tatsache, dass c-Fos nach allen Behandlungen in sehr vielen Neuronen gebildet wurde legt die Vermutung nahe, dass nicht alle c-Fos bildenden Neurone sich anhaltend plastisch verändern. Vielmehr könnten es sein, dass c-Fos zwar für die Ausbildung plastischer Veränderungen notwendig ist, sich aber nicht zwangsläufig alle c-Fos-Neurone plastisch verändern. Somit wäre c-Fos als Aktivitätsmarker auf neuronaler Ebene anzusehen. Dementsprechend kam es in der vorliegenden Arbeit zu einer Aktivierung von sehr vielen Neuronen, während nur eine Untergruppe dieser Neurone sich plastisch verändern. Es ist nahe liegend anzunehmen, dass es sich bei dieser Untergruppe um die Arg3.1-bildenden Neurone handelt, die vermutlich besonders stark aktiviert wurden.

Arg3.1 und c-Fos-Neurone zeigten nach der akustischen Stimulation ein lokales Maximum in den Schichten III und IV. Im Gegensatz dazu wurden nach Salicylatinjektion nur c-Fos-Neurone vermehrt in diesen Schichten gefunden, während Arg3.1-Neurone gleichmäßig über alle corticalen Schichten verteilt vorlagen. Die Schichten III und IV stellen die Haupteingangsschichten aus dem auditorischen Thalamus (vMGB) dar und eine erhöhte Genexpression in diesen Schichten kann somit auf eine erhöhte Eingangsaktivität aus dem vMGB zurückgeführt werden. Im Fall der akustischen Stimulation kommt die erhöhte Eingangsaktivität über den intensiven akustischen Reiz zustande. Nach Salicylatinjektion könnte die erhöhte c-Fos-Bildung in den Schichten III und IV, wie in Kapitel 4.4. diskutiert, über die Aktivierung des thalamocorticalen Systems als Reaktion auf die Deafferentierung erklärt werden. Die Bildung von Arg3.1, die nach Salicylatinjektion in den Neuronen aller Schichten beobachtet wird, sollte jedoch über zusätzliche diffus in den Cortex projizierende Systeme moduliert werden (siehe 4.6).

Die akustischen Stimulationen führten im AC zu einer maximalen Arg3.1-Bildung in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz. Dementsprechend kann ein starker akustischer Reiz anscheinend zu plastischen Veränderungen in den betroffenen Frequenzbereichen des AC führen. Interessanterweise kommt es auch nach Salicylatinjektionen zur Bildung von Arg3.1 in definierten Frequenzbereichen des AC, obwohl der auditorische Eingang vermindert ist und kein akustischer Reiz zu Grunde liegt. Es ist bekannt, dass hohe Dosen Salicylat bei Nagern (Brennan und Jastreboff, 1991) und Menschen (Cazals, 2000) zur Wahrnehmung eines hochfrequenten Tinnitus führen. Zudem wurde gezeigt, dass die Gabe von Salicylat zu einem Hörschaden führt, der verstärkt die Frequenzen zwischen 8-32 kHz betrifft (Müller et al., 2003). Der verminderte Eingang führt zu einer Aktivierung des thalamocorticalen Systems, die in den Bereichen des größten Hörschadens, also in den hochfrequenten Bereichen am stärksten ausgeprägt sein sollte (siehe 4.4). Entsprechend wurden Arg3.1-Neurone nach Salicylatinjektion vermehrt im hochfrequenten Bereich des AC gefunden. In diesem Bereich lagen die Arg3.1-bildenden Neurone in allen corticalen Schichten vor. Solche „corticalen Kolumnen“ sind die funktionelle Einheit des Cortex (Mountcastle, 1997). Plastischen Veränderungen innerhalb solcher Kolumnen könnten dazu führen, dass Neurone innerhalb einer oder mehrerer Kolumnen sich wie bei einem epileptischen Anfall immer wieder selbst erregen. Da der AC verschiedene Arten der Stimulation nicht unterscheiden kann, könnte eine solche immer wiederkehrende Selbsterregung als akustisches Perzept, also als Tinnitus, wahrgenommen werden. Innerhalb einer Kolumne kommt es zu zahlreichen Verschaltungen hemmender und erregender Neurone verschiedener Schichten. Potenziell könnten von den plastischen Veränderungen sowohl die inhibitorischen Interneurone, als auch die erregenden Pyramiden- oder Sternzellen betroffen sein. Verschiedene Autoren haben gezeigt, dass inhibitorische Interneurone entscheidend an der Ausbildung synchroner und oszillierender Netzwerkaktivitäten im Cortex beteiligt sind (Buzsaki und Chrobak, 1995; Somogyi et al., 1998, McBain und Fishan, 2001). Es wäre daher denkbar, dass plastische Veränderungen dieser inhibitorischen Interneurone für die hypothetisierte Selbsterregung der corticalen Kolumnen verantwortlich sind. Die vorliegenden Ergebnisse aus den Fluoreszenz-Doppelfärbungen zeigen jedoch, dass Arg3.1 nach Salicylatinjektionen im AC ausschließlich in exzitatorischen Pyramidenzellen gebildet wird. Man kann daher annehmen, dass plastische Veränderungen nach Tinnitusinduktion vermehrt erregende Neurone betreffen und diese vermutlich über einen Wegfall von Inhibition stimuliert werden. Ein Wegfall oder eine Verschlechterung der Inhibition wurde

von verschiedenen Autoren nach einer sensorischen Deafferentierung beobachtet (Jung und Shin, 2002; Levy et al., 2002) und im Zusammenhang mit plastischen Veränderungen als Antwort auf den verminderten sensorischen Eingang diskutiert (Rajan, 2001; Xiao und Suga, 2002).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Salicylatinjektionen plastische Veränderungen im hochfrequenten Bereich des AC hervorrufen und dass von diesen Veränderungen im Cortex nur die exzitatorischen Neurone innerhalb einer „corticalen Kolumne“ betroffen sind. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Bildung von Arg3.1 und die damit einhergehenden plastischen Veränderungen im Cortex nicht alleine über den Eingang aus dem Thalamus stimuliert werden können, sondern vermutlich zusätzlich über diffus in den Cortex projizierende Systeme moduliert werden.

4.6 Modulation der plastischen Veränderungen im auditorischen Cortex nach Salicylatinjektion

Für die Modulation der Antworteigenschaften der corticalen Neurone kommen verschiedene Transmittersysteme in Betracht. Dazu gehören Acetylcholin, Noradrenalin, Serotonin, Dopamin und Histamin. Diese modulatorischen Transmitter gelangen über Projektionen aus subcorticalen Gebieten in den Cortex. Generell scheint die modulatorische Wirkung auf einer Beeinflussung der NMDA-Rezeptor-Antwort zu beruhen. Eines der wichtigsten Systeme für die Modulation corticaler Plastizität ist der Nucleus basalis (NB), der im magnozellulären Teil des basalen Vorderhirns lokalisiert ist und dessen cholinergen Bahnen diffus in den Cortex projizieren (z.B. Gu, 2002; Edeline 2003; Weinberger, 2003). Die cholinergen Terminalien im Cortex zeigen eine deutliche Schichtenspezifität, die sich allerdings zwischen verschiedenen zytoarchitektonischen Regionen und zwischen Spezies stark unterscheiden kann (Gu, 2002). Für den AC der Wüstenrennmaus ist die Lokalisation der cholinergen Terminalien im AC nicht genauer untersucht. Plastische Veränderungen der Neurone im AC können über elektrische Stimulation des NB oder die Applikation cholinergischer Agonisten hervorgerufen werden (Metherate und Ashe, 1991; Bjordahl et al., 1998; Kilgard und Merzenich, 1998; Weinberger und Bakin, 1998; Weinberger, 2003; Ma und Suga, 2003). Zudem kommt es zu einer Erhöhung der spontanen Feuerrate, wenn man cholinerge Agonisten *in-vitro*

appliziert (Cox, et al. 1994; Shulz et al., 1997). Die Wirkung des Acetylcholins im Cortex wird hauptsächlich über die muscarinergen M_1 -Rezeptoren vermittelt, die vermutlich die Leitfähigkeit für Kalium in corticalen Neuronen herabsetzen (McCormick und Prince, 1985). Dadurch kann es zu einer verstärkten Antwort auf erregende Eingänge und zu einer Erhöhung der NMDA-Rezeptor vermittelten Leitfähigkeit kommen (Bröcher et al., 1992; Kirkwood et al., 1999). Auch der Einfluss, den M_1 -Rezeptoren auf intrazelluläre „*second messenger*“ Systeme ausüben, resultiert in einer Verstärkung der NMDA-Rezeptor vermittelten synaptischen Plastizität (Markram und Segal, 1992).

Eine Quelle der Aktivierung des NB stellt in der vorliegenden Arbeit die Amygdala dar. Arg3.1-Neurone wurden vermehrt in der lateralen Untereinheit der zentralen Amygdala gefunden, von der aus Projektionen in den NB ziehen (Jolkonnen et al., 2002). Die Amygdala spielt eine große Rolle beim Lernen aversiver Reize (Adolphs et al., 1995; LeDoux, 2003). Allerdings bestehen einige Unklarheiten bezüglich der Art ihrer Beteiligung. Entweder ist sie eine Schlüsselregion assoziativer Plastizität oder sie ist nur vorübergehend an der Bildung von Gedächtnisinhalten beteiligt (McGaugh et al., 1996; McGaugh et al., 2002; Cahill und McGaugh, 1998; Fanselow und LeDoux, 1999). Die erhöhte Anzahl an Arg3.1- und c-Fos-Neuronen in LA und CeA nach Tinnitusauslösung weist auf plastische Veränderungen in diesen Strukturen hin. Diese Annahme stimmt mit dem Befund von Quirk et al. (1997) überein, der zeigte, dass Neurone des AC ihr verstärktes Antwortverhalten nach Konditionierung beibehielten, während in den Neuronen der Amygdala eine baldige Extinktion des konditionierten Antwortverhaltens zu beobachten war. Nach Poremba und Gabriel (1999) stellt die Amygdala ein intermediäres Gedächtnissystem dar, welches meist in stressvollen Situationen aktiviert wird. In Einklang damit schlugen Kapp et al. (1992) vor, dass CeA optimal geeignet ist, um einen unkonditionierten mit einem konditionierten Reiz zu assoziieren, da sie vornehmlich auf unkonditionierte Stressoren reagiert und zusätzlich über LA Informationen über sensorische Reize erhält. Da hohe Konzentrationen an Salicylat zu Änderungen in der Atemfrequenz führen (Forth et al., 1992) und eine erhöhten Anzahl c-Fos-Neurone in Hirnstammregionen, die solche Änderungen regulieren, gefunden wurden (Wallhäuser-Franke, 1997), kann man annehmen, dass die Aktivierung der CeA in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich auf stressrelevante Eingänge zurückzuführen ist.

Dass die Bildung von Arg3.1 und c-Fos tatsächlich über cholinerge Mechanismen stimuliert wurde, zeigen die Experimente der vorliegenden Arbeit, in denen der muscarinerge Acetylcholinrezeptor-Antagonist Scopolamin zusammen mit Salicylat

verabreicht wurde (2.3 und 3.2). In diesen Tieren kam es im AC im Vergleich zu Tieren die nur mit Salicylat behandelt worden, zu einer kompletten Unterdrückung der Arg3.1-Bildung und einer Reduktion der c-Fos-Bildung. Interessanterweise zeigte sich in CeA keine Änderung in der Anzahl der markierten Neurone. Die Befunde zeigen daher zum einen, dass CeA und AC über getrennte Mechanismen aktiviert werden. Zum anderen bestätigen sie die Annahme, dass die Arg3.1 und c-Fos-Bildung im AC über cholinerge Mechanismen stimuliert wird. Dementsprechend könnte die stressinduzierte Aktivierung der Amygdala die plastischen Veränderungen im AC über ihre Projektionen in den NB modulieren.

4.7 Neuronale Plastizität und das Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es nach Tinnitusauslösung durch Salicylat zu einem reduzierten auditorischen Eingang bei gleichzeitiger Aktivierung des AC kommt. Sie bestätigen daher unsere früheren Ergebnisse und stehen in Einklang mit unserem Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus (Langner und Wallhäusser-Franke, 1999; Wallhäusser-Franke und Langner, 2001; siehe auch 1.3.3). Die hier präsentierten Daten liefern darüber hinaus neue Erkenntnisse über die Interaktion zwischen der Amygdala und dem AC. Die Gabe des muscarinergen Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin führt zu einer Unterdrückung der Arg3.1- und c-Fos-Bildung im AC, während die Anzahl der markierten Neurone in CeA durch diese Behandlung nicht beeinflusst wurde. Dies weist auf eine vom Cortex unabhängige Aktivierung der CeA hin, die vermutlich über stressbedingte Faktoren hervorgerufen wird. Gleichzeitig zeigt es, dass die Arg3.1-Bildung und die damit einhergehenden plastischen Veränderungen im AC über cholinerge Mechanismen stimuliert werden. Mit größter Wahrscheinlichkeit werden diese Veränderungen über die Aktivierung der Amygdala und ihre Projektionen in den Nucleus basalis ausgelöst. Zudem konnte ich zeigen, dass die plastischen Veränderungen nach Salicylatinjektion vermehrt den hochfrequenten Bereich des AC betreffen (siehe 4.5). Man nimmt an, dass plastische Veränderungen im AC den Hebbischen Lernregeln folgen (Weinberger and Bakin, 1998; Cruikshank and Weinberger, 1996a,b). Diese besagen, dass die Übertragung zwischen Neuronen verstärkt wird, wenn ein präsynaptischer Eingang und eine postsynaptische Zelle gleichzeitig aktiv sind. Durch den Wegfall der lateralen Inhibition kommt es speziell in den Randbereichen eines Hörschadens zu einer verstärkten Aktivierung. Gleichzeitig kommt es über modulierende cholinerge Eingänge aus dem NB, die in diesem Szenario über die Amygdala aktiviert werden, zu einer unspezifischen Aktivierung des Cortex. An den „koaktivierten“ corticalen Neuronen im AC kann es dann analog der Hebbischen Regeln zu einer Verstärkung der synaptischen Übertragung kommen. Dieser Annahme entsprechend wurden Arg3.1-bildende Neurone nach Salicylatinjektion korrespondierend zum ausgelösten Hörschaden vornehmlich im hochfrequenten Bereich des AC gefunden. Es ist naheliegend anzunehmen, dass die Frequenz in der der Tinnitus wahrgenommen wird mit den Frequenzen übereinstimmt, in denen die größte Aktivierung im AC stattfindet. In Einklang wurde gezeigt, dass hohe

Dosen Salicylat bei Nagern (Brennan und Jastreboff, 1991) und Menschen (Cazals, 2000) zur Wahrnehmung eines hochfrequenten Tinnitus führen.

Zusammenfassend kann man daher das Modell zur zentralen Entstehung wie folgt erweitern. Eine Hörstörung im Innenohr führt über den Wegfall der lateralen Inhibition zu einer verstärkten Aktivierung des thalamocorticalen Systems. Dabei könnte es in den weniger stark geschädigten Randbereichen des Hörschadens bereits zu einer Aktivierung des AC kommen, die als Tinnitus wahrgenommen wird. Dieser Tinnitus wäre vergleichbar mit Ohrgeräuschen, die normal hörende Versuchspersonen wahrnehmen, wenn sie sich in einer schallisolierten Umgebung befinden (Heller und Bergmann, 1953) oder mit solchen die kurzzeitig spontan entstehen können. Meist passiert dies schon nach kurzfristiger Reduktion des auditorischen Eingangs. Es wäre vorstellbar, dass für die Wahrnehmung dieser Geräusche aufmerksamkeitssteuernde Hirnregionen wie der Locus coeruleus aktiv sein müssen. Über starke Emotionen, traumatische Erlebnisse oder stressbedingte Einflüsse kommt es unabhängig von den Veränderungen im auditorischen System zu einer Aktivierung der Amygdala, die über ihre Projektionen in den NB und die von dort in den AC ziehenden cholinergen Bahnen zu einer zusätzlichen, unspezifischen Aktivierung des AC führt. Die Koaktivierung des AC führt zu plastischen Veränderungen im AC und zu einer Verstärkung und Stabilisierung der Tinnitusaktivität. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte die Aktivierung des thalamocorticalen Systems über die Projektionen des Cortex und des MGB in die LA zusätzlich Einfluss auf die Aktivierung der Amygdala nehmen, d.h. der Tinnitus selbst wird zum Stressor und die Aktivierung der Amygdala wird verstärkt. In diesem Fall würden die Projektionen CeA-NB-AC-LA-CeA den so genannten Teufelskreis der Tinnituserstehung repräsentieren. Dabei geht man davon aus, dass Tinnitus durch Stress ausgelöst wird und der Tinnitus zusätzlichen Stress verursacht, wodurch die Tinnitusaktivität weiter verstärkt wird, was sich wiederum verstärkend auf den Stress auswirkt. Bleibt der Hörschaden und die stressbedingte Aktivierung der Amygdala über lange Zeiträume bestehen, könnten die plastischen Veränderungen im Kortex so stark werden, dass sie in einer Selbsterregung der Neurone innerhalb der corticalen Kolumnen und damit in einer von der Peripherie unabhängigen Tinnitusaktivität resultieren.

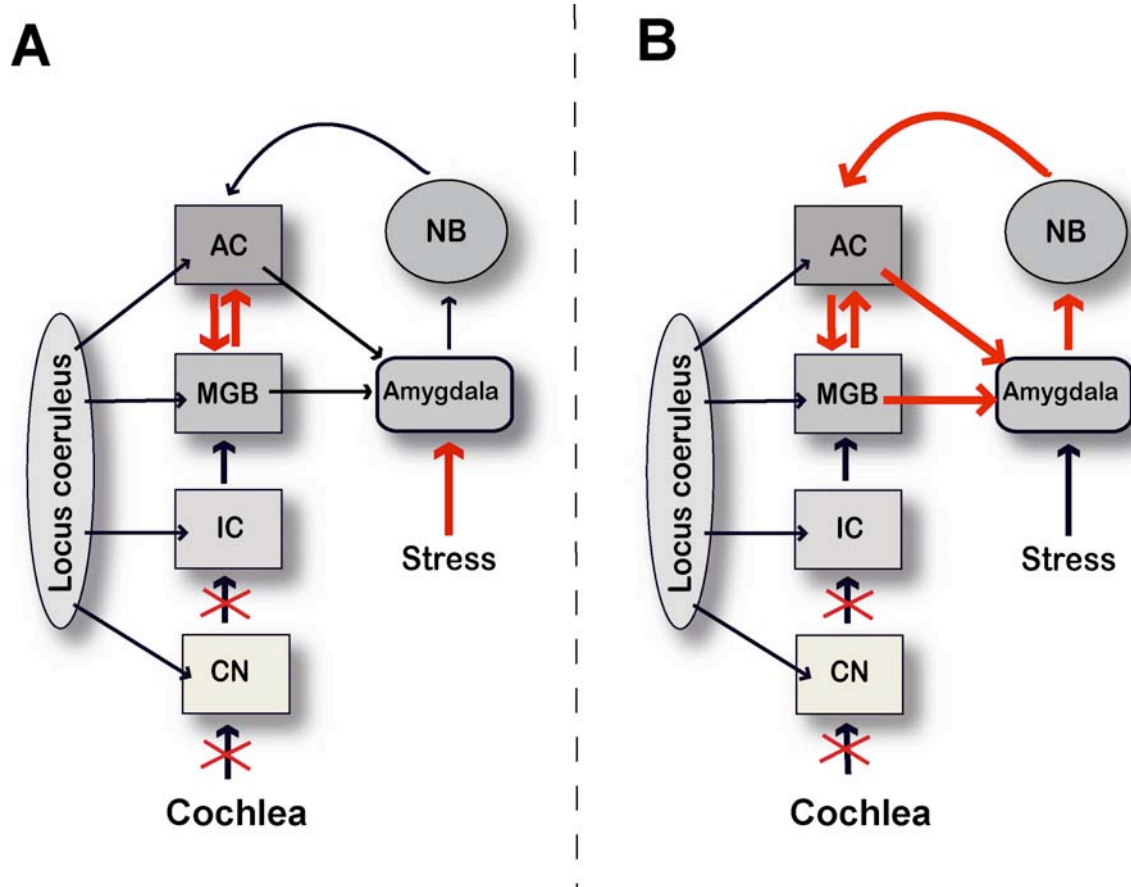


Abb.4.2 Erweitertes Modell zur zentralen Entstehung von Tinnitus

Eingezeichnet sind nur die für das Modell relevanten Verbindungen und Hirnstrukturen. **A:** Der verminderte auditorische Eingang führt zu einem Wegfall der lateralen Inhibition und einer Aktivierung des thalamocorticalen Systems in den weniger stark geschädigten Randfrequenzen des Hörschadens. Der Locus coeruleus regelt über weitverbreitete noradrenerge Projektionen den generellen Wachheitsgrad, der eine Voraussetzung für die bewusste Tinnituswahrnehmung ist. Starke Emotionen oder ein Übermaß an Stress führen unabhängig von der Aktivierung des AC zu einer Aktivierung der Amygdala. Die Amygdala kann über ihre Projektionen in den Nucleus basalis die thalamocorticalen Rückkopplung verstärken und plastische Veränderungen im AC auslösen. **B:** Bleibt der Hörschaden und die Aktivierung der Amygdala für einige Zeit bestehen, wird die Aktivität in den positiven Rückkopplungsschleifen zwischen dem auditorischen System und der Amygdala verstärkt und die kreisende Aktivität innerhalb dieser Rückkopplungsschleifen führt zu einer weiteren Stabilisierung der Tinnitusaktivität im AC. AC - auditorischer Cortex, CN - Nucleus cochlearis, IC - Colliculus inferior, MGB - medialer Kniekörper, NB - Nucleus basalis

Nach unseren Befunden finden plastische Veränderungen im auditorischen System nach Tinnitusauslösung zunächst im AC statt. Im Gegensatz dazu postulierten andere Autoren subcorticale Veränderungen im IC und DCN. Diese Veränderungen wurden jedoch nach längeren Zeiträumen gefunden (Zhang und Kaltenbach, 1998; Kaltenbach und Afman, 2000; Brozoski et al., 2002; Wu et al., 2003, Zhang et al., 2003) und können über *top-down* Effekte erklärt werden. Permanente Veränderungen der corticalen Organisation können zu

einer erhöhten Aktivierung in den absteigenden Bahnen vom Cortex zur Peripherie führen (Eggermont, 2003). In Einklang mit dieser Annahme fanden Gao und Suga (2000), dass eine Inaktivierung des AC plastische Veränderungen im IC verhinderte. Gleichzeitig führte eine fokussierte elektrische Stimulation im primären auditorischen Feld AI zu plastischen Veränderungen in AC und IC, wie sie auch nach Konditionierungs-Experimenten beobachtet wurden (Gao und Suga, 2000).

Da ein Salicylat induzierter Tinnitus meist komplett reversibel ist, können die von mir beobachteten Veränderungen nur als ein erster Schritt in Richtung der Chronifizierung eines Tinnitus angesehen werden. Dennoch erscheint es vernünftig anzunehmen, dass weitere strukturelle Veränderungen in den beschriebenen Hirnregionen und über die beschriebenen Mechanismen ausgelöst werden. Es ist bekannt, dass ein dauerhaft verminderter sensorischer Eingang zu schwerwiegenden Veränderungen, wie der Umstrukturierung corticaler Karten führt. Solche Umstrukturierungen gehen mit Phantomwahrnehmungen, wie Phantomschmerzen oder Tinnitus einher. Die Intensität einer Phantomwahrnehmung scheint dabei mit dem Ausmaß der corticalen Umorganisation korreliert zu sein (Flor et al., 1995, Knecht et al., 1996, Mühlnickel et al., 1998). Obwohl die Plastizität im Cortex zunächst als ein adaptiver Mechanismus angesehen werden kann, kann sie demnach durchaus unvorteilhafte Konsequenzen haben und es stellt sich die Frage, ob eine erweiterte Repräsentation von Frequenzen in den Randbereichen eines Hörschadens, wie sie bei hörgeschädigten Patienten (Buss et al. 1998) oder bei Tieren nach Läsion der Cochlea auftreten (Irvine, 2000; Syka, 2002), nützliche Informationen trägt oder aber zu irritierenden Wahrnehmungen wie Tinnitus führen kann.

4.8 Ausblick

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse erscheint es sinnvoll, die cholinergen Mechanismen und den Effekt von Scopolamin auf die Entstehung von Tinnitus näher zu untersuchen. In Verhaltensexperimenten könnte man prüfen, ob die Gabe von Scopolamin nach experimenteller Tinnitusauslösung zu einer Unterdrückung der Geräuschwahrnehmung in Versuchstieren führt. Um zu spezifizieren, ob die plastischen Veränderungen tatsächlich über die cholinergen Bahnen aus dem NB stimuliert werden, könnte man diese Bahnen mit Hilfe des Immunotoxins IgG192 gekoppelt an Saporin spezifisch zerstören. IgG192-Saporin bindet spezifisch an den Neurotrophinrezeptor p75,

der im Cortex nur in den cholinergen Terminalien vorkommt. Das Immunotoxin wird von den cholinergen Endknöpfchen aufgenommen und in den Zellkörper transportiert, wo es gezielt die cholinergen Projektionsneurone zerstört (Heckers et al., 1994; Holley et al. 1994; Dornan et al. 1997; Wenk, 1997; Bucci et al., 1998) Eine Applikation des Immunotoxins direkt im oder auf den AC würde somit ganz spezifisch die Projektionen aus dem NB in den AC zerstören, während das zentrale Nervensystem ansonsten unbeeinflusst blieb. Weiterhin wäre es interessant zu überprüfen, ob eine Unterdrückung der Aktivität der zentralen Amygdala die Bildung plastizitätsrelevanter Proteine in AC unterdrückt. Über elektrophysiologische Messungen könnte man untersuchen, ob es nach experimenteller Tinnitusauslösung zu einer erhöhten Spontanaktivität oder einer verstärkten Antwort auf akustische Signale kommt und ob diese Veränderungen durch die iontophoretische Applikation eines Acetylcholinrezeptor-Antagonisten unterdrückt werden können. Falls sich in weiteren Experimenten bestätigen sollte, dass Scopolamin oder andere Acetylcholinrezeptor-Antagonisten die Tinnitusaktivität im Cortex unterdrücken, könnte man über eine pharmakologische Anwendung dieser Substanzen bei Tinnituspatienten nachdenken. Eventuell könnten Acetylcholinrezeptor-Antagonisten prophylaktisch eingesetzt werden, um einer Entstehung von Tinnitus z.B. nach einem plötzlichen Hörverlust oder einer Operation am Innenohr vorzubeugen.

Eine ähnliche Strategie wurde von Ziegelgänsberger (2003) bezüglich der Entstehung chronischer Schmerzen vorgeschlagen. Es ist bekannt, dass in der Amygdala eine besonders hohe Konzentration an Cannabinoid-Rezeptoren vorliegt. Marsicano et al. (2002) zeigten, dass Ratten, bei denen die Gene für diese Rezeptoren ausgeschaltet waren, ein antrainiertes Angstverhalten nicht mehr vergessen konnten. Die Autoren postulierten daher, dass Cannabinoide und ihre natürliche Wirkung auf die Amygdala notwendig sind, um „falsche“ Assoziationen zu verlernen. Ziegelgänsberger (2003) schlug daher vor Cannabinoide prophylaktisch nach Operationen zu verabreichen, die in vielen Fällen chronische Schmerzen nach sich ziehen.

Insgesamt erscheint neben der Behandlung der Hörstörung, eine Beeinflussung der Amygdala als sinnvollste Therapie bei Tinnitus. Auch die bisher erfolgreichste Therapie gegen Tinnitus, die „Tinnitus Retraining Therapie“, zielt auf eine Beeinflussung der mit Tinnitus einhergehenden negativen Emotionen und damit auf eine Beeinflussung der Amygdala ab. Bei dieser Therapie wird versucht die antrainierte negative Assoziation mit Tinnitus über psychologische Betreuung und gezielte Übungen aufzulösen und damit die Aufmerksamkeit von den Ohrgeräuschen wegzuleiten. In den seltensten Fällen kommt es

dabei zu einem Verschwinden der Ohrgeräusche. Dennoch wird in vielen Fällen erreicht, dass Patienten nach der Therapie besser mit ihren Ohrgeräuschen leben können.

Zukünftige Arbeiten sollten sich daher in jedem Fall näher mit der pharmakologischen und verhaltenstherapeutischen Beeinflussbarkeit der zentralen Amygdala beschäftigen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung der neuronalen Plastizitätsmarker Arg3.1 und c-Fos im auditorischen und limbischen System der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*) nach experimenteller Tinnitusauslösung durch Salicylat untersucht und mit der Bildung dieser Proteine nach akustischer Stimulation und Salinebehandlung verglichen. Für den Nachweis der Proteine wurde ein klassisches immunhistochemisches Verfahren verwendet.

Es zeigte sich, dass die Position der Arg3.1-bildenden Neurone im auditorischen Cortex (AC) nach akustischer Stimulation von der Stimulationsfrequenz abhängt. Nach Salicylatinjektion liegen Arg3.1-Neurone vermehrt im hochfrequenten Bereich des AC vor. Dagegen führen Salineinjektionen zu einer uneinheitlichen Verteilung und einer schwächeren Arg3.1-Markierung. C-Fos-Neurone werden nach allen Behandlungen wesentlich häufiger gefunden und zeigen eine breitere Verteilung. In subcorticalen auditorischen Gebieten werden im Vergleich zu den anderen Behandlungen nach Salicylatinjektion wesentlich weniger c-Fos-Neurone gefunden, ein Befund der auf die salicylatbedingte Reduktion des Hörvermögens zurückzuführen ist. In der zentralen (CeA) und lateralen Amygdala führen nur Salicylatinjektionen zu einer deutlichen Arg3.1 und c-Fos Markierung. Mit Hilfe einer radioaktiven in situ-Hybridisierung wurde gezeigt, dass auch die *arg3.1*-mRNA nur nach Salicylatinjektion in CeA erhöht ist. Die simultane Gabe von Salicylat zusammen mit dem muscarinergen Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Scopolamin führt im Vergleich zu einer reinen Salicylatgabe zu einer Unterdrückung der Arg3.1- und c-Fos- Bildung im AC, während die Anzahl der markierten Neurone in CeA vergleichbar ist. Eine nähere Charakterisierung der Arg3.1-Neurone über Fluoreszenz-Doppelmarkierungen ergab, dass Arg3.1 in einer Untergruppe von c-Fos-Neuronen gebildet wird. Zudem liegt Arg3.1 im AC nur in exzitatorischen Pyramidenzellen vor.

Nach experimenteller Tinnitusauslösung kommt es demnach zu plastischen Veränderungen im AC und der Amygdala. Die Aktivierung des AC ist dabei als Reaktion auf den salicylatbedingten Hörschaden anzusehen, während die plastischen Veränderungen im AC vermutlich über die stressbedingte Aktivierung der Amygdala moduliert werden. Dabei könnte der Einfluss der Amygdala über ihre Verbindungen in den Nucleus basalis vermittelt werden, der bekanntermaßen cholinerg in den AC projiziert. Die Arg3.1-relevanten Veränderungen im AC werden vornehmlich im hochfrequenten Bereich des AC beobachtet und betreffen dort ausschließlich exzitatorischen Pyramidenzellen.

6 Literaturverzeichnis

- Adams, J. C. 1995, "Sound stimulation induces Fos-related antigens in cells with common morphological properties throughout the auditory brainstem", *J.Comp Neurol.*, 361, 645-668.
- Adelmann, 1987, "Encyclopedia of Neuroscience". Birkhäuser Boston, Basel, Stuttgart
- Adolphs, R., Tranel, D., Damasio, H., & Damasio, A. R., 1995, "Fear and the human amygdala", *Journal of Neuroscience*, 15, 5879-5891.
- Amaral, D. G., 1986, "Amygdalohippocampal and amygdalocortical projections in the primate brain", *Adv.Exp.Med.Biol.*, 203, 3-17.
- Andersson, G., Lyttkens, L., Hirvela, C., Furmark, T., Tillfors, M., & Fredrikson, M., 2000, "Regional cerebral blood flow during tinnitus: a PET case study with lidocaine and auditory stimulation", *Acta Otolaryngol.*, 120, 967-972.
- Arnold, W., Bartenstein, P., Oestreicher, E., Romer, W., & Schwaiger, M., 1996, "Focal metabolic activation in the predominant left auditory cortex in patients suffering from tinnitus: a PET study with [18F]deoxyglucose", *ORL J.Otorhinolaryngol.Relat Spec.*, 58, 195-199.
- Bajo, V.M., Maresh, K., Doubell, T., Moore, D.R., King, A.J., 2003, „Expression by Acoustic Stimulation of Immediate- early Genes, c-fos and Arc, in the Gerbil Auditory System“. *26 th Annual Meeting of the Association for Research in Otolaryngology*, 200.
- Barth, D. S. & MacDonald, K. D., 1996, "Thalamic modulation of high-frequency oscillating potentials in auditory cortex", *Nature*, 383, 78-81.
- Bauer, C. A., Brozoski, T. J., Rojas, R., Boley, J., & Wyder, M., 1999, "Behavioral model of chronic tinnitus in rats", *Otolaryngol.Head Neck Surg.*, 121, 457-462.
- Bauer, C. A. & Brozoski, T. J., 2001, "Assessing tinnitus and prospective tinnitus therapeutics using a psychophysical animal model", *Jaro*, 2, 54-64.
- Biens, H., 1999, "Bestimmung von Hörschäden anhand evozierter Potentiale des auditorischen Hirnstamms bei der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)", Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Bjordahl, T. S., Dimyan, M. A., & Weinberger, N. M., 1998, "Induction of long-term receptive field plasticity in the auditory cortex of the waking guinea pig by stimulation of the nucleus basalis", *Behavioral Neuroscience*, 112, 467-479.
- Braitenberg, V., & Schuz, A. (1991). *Anatomy of the cortex*. Berlin: Springer-Verlag
- Brennan, J. F. & Jastreboff, P. J., 1991, "Generalization of conditioned suppression during salicylate-induced phantom auditory perception in rats.", *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 51, 15-27.

- Bröcher, S., Artola, A., & Singer, W., 1992, "Agonists of cholinergic and noradrenergic receptors facilitate synergistically the induction of long-term potentiation in slices of rat visual cortex", *Brain Research*, 573, 27-36.
- Brown, M. C. & Liu, T. S., 1995, "Fos-like immunoreactivity in central auditory neurons of the mouse", *J.Comp Neurol.*, 357, 85-97.
- Brozoski, T. J., Bauer, C. A., & Caspary, D. M., 2002, "Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus", *Journal of Neuroscience*, 22, 2383-2390.
- Brozoski, T. J., Bauer, C. A., & Caspary, D. M., 2002, "Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus", *Journal of Neuroscience*, 22, 2383-2390.
- Bucci, D. J., Holland, P. C., & Gallagher, M., 1998, "Removal of cholinergic input to rat posterior parietal cortex disrupts incremental processing of conditioned stimuli", *Journal of Neuroscience*, 18, 8038-8046.
- Budinger, E., Heil, P., & Scheich, H., 2000a, "Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). III. Anatomical subdivisions and corticocortical connections", *Eur.J.Neurosci.*, 12, no. 2425-2451.
- Budinger, E., Heil, P., & Scheich, H., 2000b, "Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). IV. Connections with anatomically characterized subcortical structures", *Eur.J.Neurosci.*, 12, 2452-2474.
- Budinger, E. & Scheich, H., 2003, "Medial Prefrontal Cortex of the Gerbil: Anatomical subdivisions, thalamic connections, and auditory cortical afferents", *Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference*, 687.
- Buss, E., Hall, J. W., III, Grose, J. H., & Hatch, D. R., 1998, "Perceptual consequences of peripheral hearing loss: do edge effects exist for abrupt cochlear lesions?", *Hearing Research*, 125, 98-108.
- Buzsaki, G. & Chrobak, J. J. 1995, "Temporal structure in spatially organized neuronal ensembles: a role for interneuronal networks", *Curr.Opin.Neurobiol.*, 5, 504-510.
- Cahill, L. & McGaugh, J. L., 1998, "Mechanisms of emotional arousal and lasting declarative memory", *Trends in Neurosciences*, 21, 294-299.
- Cain, M. E., Kapp, B. S., & Puryear, C. B., 2002, "The contribution of the amygdala to conditioned thalamic arousal", *Journal of Neuroscience*, 22, 11026-11034.
- Calverley, R. K. & Jones, D. G., 1990, "Contributions of dendritic spines and perforated synapses to synaptic plasticity", *Brain Res.Brain Res.Rev.* 15, 215-249.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., & Everitt, B. J., 2002, "Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex", *Neurosci.Biobehav.Rev.*, 26, 321-352.

- Casado, M. & Ascher, P., 1998, "Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity", *J.Physiol*, 513, 317-330.
- Cazals, Y., 2000, "Auditory sensori-neural alterations induced by salicylate", *Progress in Neurobiology*, 62, 583-631.
- Chen, G. D. & Jastreboff, P. J., 1995, "Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats", *Hearing Research*, 82, 158-178.
- Chicurel, M. E. & Harris, K. M., 1992, "Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus", *J.Comp Neurol.*, 325, 169-182.
- Clapham, D. E., 1995, "Intracellular calcium. Replenishing the stores", *Nature*, 375, 634-635.
- Colby, C. L., 1991, "The neuroanatomy and neurophysiology of attention", *J.Child Neurol.*, 6, 90-118.
- Collingridge, G. L. & Lester, R. A., 1989, "Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system", *Pharmacol.Rev.*, 41, 143-210.
- Comery, T. A., Shah, R., & Greenough, W. T., 1995, "Differential rearing alters spine density on medium-sized spiny neurons in the rat corpus striatum: evidence for association of morphological plasticity with early response gene expression", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 63, 217-219.
- Corkin, S., 1979, "Hidden-figures-test performance: lasting effects of unilateral penetrating head injury and transient effects of bilateral cingulotomy", *Neuropsychologia*, 17, 585-605.
- Cotillon, N., Nafati, M., & Edeline, J. M., 2000, "Characteristics of reliable tone-evoked oscillations in the rat thalamo-cortical auditory system", *Hearing Research*, 142, 113-130.
- Cox, C. L., Metherate, R., & Ashe, J. H., 1994, "Modulation of cellular excitability in neocortex: muscarinic receptor and second messenger-mediated actions of acetylcholine", *Synapse*, 16, 123-136.
- Cruikshank, S. J. & Weinberger, N. M., 1996a, "Evidence for the Hebbian hypothesis in experience-dependent physiological plasticity of neocortex: a critical review", *Brain Res.Brain Res.Rev.*, 22, 191-228.
- Cruikshank, S. J. & Weinberger, N. M., 1996b, "Receptive-field plasticity in the adult auditory cortex induced by Hebbian covariance", *Journal of Neuroscience*, 16, 861-875.
- Devinsky, O., Morrell, M. J., & Vogt, B. A., 1995, "Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour", *Brain*, 118, 279-306.
- Dornan, W. A., McCampbell, A. R., Tinkler, G. P., Hickman, L. J., Bannon, A. W., Decker, M. W., & Gunther, K. L., 1997, "Comparison of site specific injections into the basal forebrain on water maze and radial arm maze performance in the male rat after immunolesioning with 192 IgG saporin", *Behav.Brain Res.*, 86, 181-189.

- Dragunow, M. & Faull, R., 1989, "The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing", *Journal of Neuroscience Methods*, 29, 261-265.
- Edeline, J. M. 2003, "The thalamo-cortical auditory receptive fields: regulation by the states of vigilance, learning and the neuromodulatory systems", *Exp.Brain Res.*, 153, 554-572.
- Eggermont, J. J. & Kenmochi, M., 1998, "Salicylate and quinine selectively increase spontaneous firing rates in secondary auditory cortex", *Hearing Research*, 117 149-160.
- Eggermont, J. J., 2003, "Central tinnitus", *Auris Nasus Larynx*, 30 Suppl, 7-12.
- Ehret, G. & Fischer, R., 1991, "Neuronal activity and tonotopy in the auditory system visualized by c-fos gene expression", *Brain Research*, 567, 350-354.
- Ehret, G. und Romand, R., 1997, "The Central Auditory System", *Oxford University Press, New York, Oxford*
- Fanselow, M. S. & LeDoux, J. E., 1999, "Why we think plasticity underlying Pavlovian fear conditioning occurs in the basolateral amygdala", *Neuron*, 23, 229-232.
- Feldmann, H., 1998, "Tinnitus; Grundlagen einer rationalen Diagnostik und Therapie", *Thieme Verlag, Stuttgart, New York*
- Finkbeiner, S. & Greenberg, M. E., 1998, "Ca²⁺ channel-regulated neuronal gene expression", *Journal of Neurobiology*, 37, 171-189.
- Fleischmann, A., Hvalby, O., Jensen, V., Strekalova, T., Zacher, C., Layer, L. E., Kvello, A., Reschke, M., Spanagel, R., Sprengel, R., Wagner, E. F., & Gass, P., 2003, "Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS", *Journal of Neuroscience*, 23, 9116-9122.
- Flor, H., Elbert, T., Knecht, S., Wienbruch, C., Pantev, C., Birbaumer, N., Larbig, W., & Taub, E., 1995, "Phantom-limb pain as a perceptual correlate of cortical reorganization following arm amputation", *Nature*, 375, 482-484.
- Flower, R. J., 1980, "Regulation of pulmonary arachidonic acid metabolism by anti-inflammatory steroids", *Ciba Found.Symp.*, 78, 185-201.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., 1992, "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie", *BI-Wiss-Verl.*, 6th edition, 217-219
- Friauf, E., 1992, "Tonotopic Order in the Adult and Developing Auditory System of the Rat as Shown by c-fos Immunocytochemistry", *Eur.J.Neurosci.*, 4, 798-812.
- Gabriel, M., Saltwick, S. E., & Miller, J. D., 1975, "Conditioning and reversal of short-latency multiple-unit responses in the rabbit medial geniculate nucleus", *Science*, 189, 1108-1109.
- Gallagher, M. & Holland, P. C., 1994, "The amygdala complex: multiple roles in associative learning and attention", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, 11771-11776.

- Gao, E. & Suga, N., 2000, "Experience-dependent plasticity in the auditory cortex and the inferior colliculus of bats: role of the corticofugal system", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97, 8081-8086.
- Gerken, G. M., 1996, "Central tinnitus and lateral inhibition: an auditory brainstem model", *Hearing Research*, 97, 75-83.
- Ghosh, A. & Greenberg, M. E., 1995, "Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences", *Science*, 268, 239-247.
- Goldman-Rakic, P. S., 1988, "Topography of cognition: parallel distributed networks in primate association cortex", *Annu.Rev.Neurosci.*, 11, 137-156.
- Goldman-Rakic, P. S., 1990, "Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates", *Prog.Brain Res.*, 85, 325-335.
- Goldman-Rakic, P. S., 1995, "Cellular basis of working memory", *Neuron*, 14, 477-485.
- Greenough, W. T. & Volkmar, F. R., 1973, "Pattern of dendritic branching in occipital cortex of rats reared in complex environments", *Experimental Neurology*, 40, 491-504.
- Greenough, W. T., West, R. W., & DeVogd, T. J., 1978, "Subsynaptic plate perforations: changes with age and experience in the rat", *Science*, 202, 1096-1098.
- Gu, Q., 2002, "Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity", *Neuroscience*, 111, no. 815-835.
- Guitton, M. J., Caston, J., Ruel, J., Johnson, R. M., Pujol, R., & Puel, J. L., 2003, "Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors", *Journal of Neuroscience*, 23, 3944-3952.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A., 2000, "Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory", *Journal of Neuroscience*, 20, 3993-4001.
- Han, J. S., Holland, P. C., & Gallagher, M., 1999, "Disconnection of the amygdala central nucleus and substantia innominata/nucleus basalis disrupts increments in conditioned stimulus processing in rats", *Behavioral Neuroscience*, 113, 143-151.
- Hebb, D. O., 1949 „*The organization of behavior*“, New York: Wiley.
- Heckers, S., Ohtake, T., Wiley, R. G., Lappi, D. A., Geula, C., & Mesulam, M. M., 1994, "Complete and selective cholinergic denervation of rat neocortex and hippocampus but not amygdala by an immunotoxin against the p75 NGF receptor", *Journal of Neuroscience*, 14, 1271-1289.
- Heffner, H. & Harrington, I., 2002, "Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound", *Hearing Research*, 170, 83.
- Heller, M. F. & Bergman, M., 1953, "Tinnitus aurium in normally hearing persons", *Ann.Otol.*, 62, 73-83.

- Herbert, H., Aschoff, A., & Ostwald, J., 1991, "Topography of projections from the auditory cortex to the inferior colliculus in the rat.", *The Journal of Comparative Neurology*, 304, 103-122.
- Herdegen, T. & Leah, J. D., 1998, "Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins", *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 28, 370-490.
- Hisanaga, K., Sagar, S. M., & Sharp, F. R., 1992, "N-methyl-D-aspartate antagonists block fos-like protein expression induced via multiple signaling pathways in cultured cortical neurons", *Journal of Neurochemistry*, 58, 1836-1844.
- Holland, P. C. & Gallagher, M., 1999, "Amygdala circuitry in attentional and representational processes", *Trends in Cognitive Sciences*, 3, 65-73.
- Holley, L. A., Wiley, R. G., Lappi, D. A., & Sarter, M., 1994, "Cortical cholinergic deafferentation following the intracortical infusion of 192 IgG-saporin: a quantitative histochemical study", *Brain Research*, 663, 277-286.
- Hollmann, M. & Heinemann, S., 1994, "Cloned glutamate receptors", *Annu. Rev. Neurosci.*, 17, 31-108.
- Holstege, J.C., Biesheuvel, K., Plath, N., Jaarsma, D., 2003, „Arc Induction in the Spinal Dorsal Horn After Peripheral Nociceptive Stimulation", *Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA*, 13.9.
- Horimoto, N., Nabekura, J., & Ogawa, T., 1996, "Developmental changes in arachidonic acid potentiation of NMDA currents in cortical neurones", *NeuroReport*, 7, 2463-2467.
- Hughes, P. & Dragunow, M., 1995, "Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system", *Pharmacol. Rev.*, 47, 133-178.
- Hunt, S. P., Pini, A., & Evan, G., 1987, "Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation", *Nature*, 328, 632-634.
- Irvine, D. R., 2000, "Injury- and use-related plasticity in the adult auditory system", *J. Commun. Disord.*, 33, 293-311.
- Jastreboff, P. J., Brennan, J. F., Coleman, J. K., & Sasaki, C. T., 1988, "Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus", *Behav. Neurosci.*, 102, 811-822.
- Jastreboff, P. J. & Brennan, J. F., 1994, "Evaluating the loudness of phantom auditory perception (tinnitus) in rats", *Audiology*, 33, 202-217.
- Jastreboff, P.J., 1999, „The neurophysiological model of tinnitus and hyperacusis“, *6th Int. Tinnitus Seminar, Cambridge*, 32-38
- Jeanmonod, D., Magnin, M., & Morel, A., 1996, "Low-threshold calcium spike bursts in the human thalamus. Common physiopathology for sensory, motor and limbic positive symptoms", *Brain*, 119, 363-375.

- Jolkkonen, E. & Pitkänen, A., 1998, "Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex: projections originating in the central nucleus", *J.Comp Neurol.*, 395, 53-72.
- Jolkkonen, E., Miettinen, R., Pikkarainen, M., & Pitkänen, A., 2002, "Projections from the amygdaloid complex to the magnocellular cholinergic basal forebrain in rat", *Neuroscience*, 111, 133-149.
- Jung, S. C. & Shin, H. C. 2002, "Suppression of temporary deafferentation-induced plasticity in the primary somatosensory cortex of rats by GABA antagonist", *Neurosci.Lett.*, 334, 87-90.
- Kaltenbach, J. A. & McCaslin, D. L., 1996, "Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to high intensity sound: a possible neural correlate of tinnitus", *Auditory Neuroscience*, 3, 57-78.
- Kaltenbach, J. A. & Afman, C. E., 2000, "Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus", *Hearing Research*, 140, 165-172.
- Kandel, E.; Schwartz, J.H., Jessel, T.M., 1995, „Neurowissenschaften“, Spektrum Akademischer Verlag
- Kandel, E. R. 2001, "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses", *Science*, 294, 1030-1038.
- Kapp, B. S., Whalen, P. J., Supple, W. F., & Pascoe, J. P., 1992, „Amygdaloid Contributions to Conditioned Arousal and Sensory Information Processing“. Aggleton, J. P., *The Amygdala - Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*, Wiley-Liss, Inc., New York, 229-254
- Kapp, B. S., Supple, W. F., Jr., & Whalen, P. J., 1994, "Effects of electrical stimulation of the amygdaloid central nucleus on neocortical arousal in the rabbit", *Behav.Neurosci.*, 108, 81-93.
- Kelly, M. P. & Deadwyler, S. A., 2002, "Acquisition of a novel behavior induces higher levels of Arc mRNA than does overtrained performance", *Neuroscience*, 110, 617-626.
- Kemp, D. T., 1981, "Physiologically active cochlear micromechanics--one source of tinnitus", *Ciba Found.Symp.*, 85, 54-81.
- Kenmochi, M. & Eggermont, J. J., 1997, "Salicylate and quinine affect the central nervous system", *Hearing Research*, 113, 110-116.
- Kilgard, M. & Merzenich, M., 1998, "Research on auditory cortex plasticity - Response", *Science*, 280, 1174.
- Kirkwood, A., Rozas, C., Kirkwood, J., Perez, F., & Bear, M. F., 1999, "Modulation of long-term synaptic depression in visual cortex by acetylcholine and norepinephrine", *Journal of Neuroscience*, 19, 1599-1609.

- Kleim, J. A., Lussnig, E., Schwarz, E. R., Comery, T. A., & Greenough, W. T., 1996, "Synaptogenesis and Fos expression in the motor cortex of the adult rat after motor skill learning", *Journal of Neuroscience*, 16, 4529-4535.
- Klinke und Silbernagel, 1996, "Lehrbuch der Physiologie", Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Knecht, S., Henningsen, H., Elbert, T., Flor, H., Hohling, C., Pantev, C., & Taub, E., 1996, "Reorganizational and perceptual changes after amputation", *Brain*, 119, 1213-1219.
- Krnjevic, K., 1997, "Role of GABA in cerebral cortex", *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 75(5): 439-451
- Kuhl, D., 2000, "Learning about Activity-Dependent Genes". Baudry, M., Davis, J. L., and Thompson, R. F. *Advances in Synaptic Plasticity*. 1-31, Cambridge, Massachusetts, MIT Press, Massachusetts Institute of Technology.
- Lanahan, A. & Worley, P., 1998, "Immediate-early genes and synaptic function", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 70, 37-43.
- Langner, G., 1992, "Periodicity coding in the auditory system", *Hearing Research*, 60, 115-142.
- Langner, G., Sams, M., Heil, P., & Schulze, H. 1997, "Frequency and periodicity are represented in orthogonal maps in the human auditory cortex: evidence from magnetoencephalography", *J.Comp Physiol [A]*, 181, 665-676.
- Langner, G. & Wallhäusser-Franke, E., 1999, "Computer simulation of a tinnitus model based on labeling of tinnitus activity in the auditory cortex", *6th Int.Tinnitus Seminar, Cambridge*, 20-25
- LeDoux, J. E., Farb, C., & Ruggiero, D. A., 1990, "Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that project to the amygdala", *Journal of Neuroscience*, 10, 1043-1054.
- LeDoux, J. E. & Farb, C. R., 1991, "Neurons of the acoustic thalamus that project to the amygdala contain glutamate", *Neuroscience Letters*, 134, 145-149.
- LeDoux, J. E., 1995, "Emotion: clues from the brain", *Annu.Rev.Psychol.*, 46, 209-235.
- LeDoux, J., 2003, "The emotional brain, fear, and the amygdala", *Cellular and Molecular Neurobiology*, 23, 727-738.
- Levy, L. M., Ziemann, U., Chen, R., & Cohen, L. G. 2002, "Rapid modulation of GABA in sensorimotor cortex induced by acute deafferentation", *Ann.Neurol.*, 52, 755-761.
- Link, W., Konietzko, U., Kauselmann, G., Krug, M., Schwanke, B., Frey, U., & Kuhl, D., 1995, "Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 5734-5738.

- Lockwood, A. H., Salvi, R. J., Coad, M. L., Towsley, M. L., Wack, D. S., & Murphy, B. W., 1998, "The functional neuroanatomy of tinnitus: evidence for limbic system links and neural plasticity", *Neurology*, 50, 114-120.
- Long, G. R. & Tubis, A., 1988, "Modification of spontaneous and evoked otoacoustic emissions and associated psychoacoustic microstructure by aspirin consumption", *J.Acoust.Soc.Am.*, 84, 1343-1353.
- Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W. S., MacDonald, J. F., & Wang, Y. T., 2001, "Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons", *Neuron*, 29, 243-254.
- Lüllmann, H., Mohr, K., Ziegler, A., 1996, „Taschenatlas der Pharmakologie“, *Georg Thieme Verlag*, 106
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., & Worley, P. F. 1995, "Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites", *Neuron*, 14, 433-445.
- Ma, X. & Suga, N., 2003, "Augmentation of Plasticity of the Central Auditory System by the Basal Forebrain and/or Somatosensory Cortex", *Journal of Neurophysiology*, 89, 90-103.
- Mahlke, C., 1999, "Zeitliche Veränderungen der c-fos expression im zentralen Nervensystem des Gerbils (*Meriones unguiculatus*) nach einem Schalltrauma. Ein Tiermodell zur Tinnitusentstehung?" Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Manabe, Y., Yoshida, S., Saito, H., & Oka, H., 1997, "Effects of lidocaine on salicylate-induced discharge of neurons in the inferior colliculus of the guinea pig", *Hearing Research*, 103, 192-198.
- Markram, H. & Segal, M., 1992, "The inositol 1,4,5-trisphosphate pathway mediates cholinergic potentiation of rat hippocampal neuronal responses to NMDA", *J.Physiol*, 447, 513-533.
- Marsicano, G., Wotjak, C. T., Azad, S. C., Bisogno, T., Rammes, G., Cascio, M. G., Hermann, H., Tang, J., Hofmann, C., Zieglansberger, W., Di, M., V, & Lutz, B., 2002, "The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories", *Nature*, 418, 530-534.
- McBain, C. J. & Mayer, M. L., 1994, "N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function", *Physiol Rev.*, 74, 723-760.
- McBain, C. J. & Fisahn, A. 2001, "Interneurons unbound", *Nat.Rev.Neurosci.*, 2, 11-23.
- McCormick, D. A. & Prince, D. A., 1985, "Two types of muscarinic response to acetylcholine in mammalian cortical neurons", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 82, 6344-6348.
- McDonald, A. J., 1998, "Cortical pathways to the mammalian amygdala", *Progress in Neurobiology*, 55, 257-332.

- McFadden, D. & Plattsmier, H. S. 1984, "Aspirin abolishes spontaneous oto-acoustic emissions", *J.Acoust.Soc.Am.*, vol. 76, no. 2, pp. 443-448.
- McFadden, D. & Plattsmier, H. S., 1983, "Aspirin can potentiate the temporary hearing loss induced by intense sounds", *Hearing Research*, 9, 295-316.
- McGaugh, J. L., Cahill, L., & Roozendaal, B., 1996, "Involvement of the amygdala in memory storage: interaction with other brain systems", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 13508-13514.
- McGaugh, J. L., McIntyre, C. K., & Power, A. E., 2002, "Amygdala modulation of memory consolidation: interaction with other brain systems", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 78, 539-552.
- Mello, C., Nottebohm, F., & Clayton, D., 1995, "Repeated exposure to one song leads to a rapid and persistent decline in an immediate early gene's response to that song in zebra finch telencephalon", *Journal of Neuroscience*, 15, 6919-6925.
- Mesulam, M. M., 1990, "Large-scale neurocognitive networks and distributed processing for attention, language, and memory", *Ann.Neurol.*, 28, 597-613.
- Metherate, R. & Ashe, J. H., 1991, "Basal forebrain stimulation modifies auditory cortex responsiveness by an action at muscarinic receptors", *Brain Research*, 559, 163-167.
- Michaelis, E. K., 1998, "Molecular biology of glutamate receptors in the central nervous system and their role in excitotoxicity, oxidative stress and aging", *Progress in Neurobiology*, 54, 369-415.
- Miller, B., Sarantis, M., Traynelis, S. F., & Attwell, D., 1992, "Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid", *Nature*, 355, 722-725.
- Möller, J. und Gerecht, G., 1979, „Akustische Kommunikation bei Wüstenrennmäusen“, *Verh.Dtsch.Zool.Ges.* 72,224
- Montag-Sallaz, M., Welzl, H., Kuhl, D., Montag, D., & Schachner, M. 1999, "Novelty-induced increased expression of immediate-early genes c-fos and arg 3.1 in the mouse brain", *Journal of Neurobiology*, 38, 234-246.
- Moulin, A., Bera, J. C., & Collet, L., 1994, "Distortion product otoacoustic emissions and sensorineural hearing loss", *Audiology*, 33, 305-326.
- Mountcastle, V. B., 1997, "The columnar organization of the neocortex", *Brain*, 120 701-722.
- Mühlnickel, W., Elbert, T., Taub, E., & Flor, H., 1998, "Reorganization of auditory cortex in tinnitus", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 10340-10343.
- Muller, D., Toni, N., & Buchs, P. A., 2000, „Long-Term Potentiation: From Molecular Mechanisms to Structural Changes“. *Baudry, M., Davis, J. L., and Thompson, R. F. Advances in Synaptic Plasticity*, MIT Press, 87-102.
- Müller, M., Klinke, R., Arnold, W., & Oestreicher, E., 2003, "Auditory nerve fibre responses to salicylate revisited", *Hearing Research*, 183, 37-43.

- Noreña, A.J., Eggermont, J.J., 2003, "Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus", *Hearing Research*, 183, 137-153
- Oeken, J., 1998, "Distortion Product Otoacoustic Emissions in acute acoustic trauma", *Noise.Health*, 1, 56-66.
- Oliva, R., 1997, „Aktivierung auditorischer und limbischer Gehirngewebe nach Salicylat. C-fos Immunhistochemie an einem physiologischen Tiermodell für Tinnitus“. Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Oliver, D., He, D. Z., Klocker, N., Ludwig, J., Schulte, U., Waldegger, S., Ruppersberg, J. P., Dallos, P., & Fakler, B., 2001, "Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein", *Science*, 292, 2340-2343.
- Owren, M. J., Hopp, S. L., Sinnott, J. M., & Petersen, M. R., 1988, "Absolute auditory thresholds in three Old World monkey species (*Cercopithecus aethiops*, *C. neglectus*, *Macaca fuscata*) and humans (*Homo sapiens*)", *J.Comp Psychol.*, 102, 99-107.
- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K., 1998, "Glutamate receptors in the mammalian central nervous system", *Progress in Neurobiology*, 54, 581-618.
- Paxinos, G. & Watson, C., 1986, „The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates“, *Academic Press, Inc.*
- Pinaud, R., Penner, M. R., Robertson, H. A., & Currie, R. W., 2001, "Upregulation of the immediate early gene arc in the brains of rats exposed to environmental enrichment: implications for molecular plasticity", *Brain Res.Mol.Brain Res.*, 91, 50-56.
- Pitkänen, A., Savander, V., & LeDoux, J. E., 1997, "Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala", *Trends in Neurosciences*, 20, 517-523.
- Pitkänen, A. & Amaral, D. G., 1998, "Organization of the intrinsic connections of the monkey amygdaloid complex: projections originating in the lateral nucleus", *J.Comp Neurol.*, 398, 431-458.
- Platenik, J., Kuramoto, N., & Yoneda, Y., 2000, "Molecular mechanisms associated with long-term consolidation of the NMDA signals", *Life Sci.*, 67, 335-364.
- Plath, P., Ohana, O., Dammermann, B., Waltereit, R., Welzl, H., Bick-Sander, A., Wolfer, D. Husi, H., Errington, M., Bliss, T., Grant, S., Lipp, H. Boesl, M. Kuhl, D., 2003, Arg3.1 plays a pivotal role in the late phase of LTP and the consolidation of LTM, *Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA*, Abstract No. 375.9
- Poremba, A. & Gabriel, M., 1999, "Amygdala neurons mediate acquisition but not maintenance of instrumental avoidance behavior in rabbits", *Journal of Neuroscience*, 19, 9635-9641.
- Posner, M. I. & Petersen, S. E., 1990, "The attention system of the human brain", *Annu.Rev.Neurosci.*, 13, 25-42.

- Posner, M. I. & Rothbart, M. K., 1998, "Attention, self-regulation and consciousness", *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 353, 1915-1927.
- Preyer, S. & Bootz, F., 1995, "Tinnitus models for use in tinnitus counselling therapy of chronic tinnitus patients", *HNO*, 43, 338-351.
- Quirk, G. J., Armony, J. L., & LeDoux, J. E., 1997, "Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala", *Neuron*, 19, 613-624.
- Rajan, R. 2001, "Plasticity of excitation and inhibition in the receptive field of primary auditory cortical neurons after limited receptor organ damage", *Cerebral Cortex*, 11, 171-182.
- Reimer, K., 1993, "Simultaneous demonstration of fos-like immunoreactivity and 2-deoxyglucose uptake in the inferior colliculus of the mouse.", *Brain Research*, 616, 339-343.
- Rial Verde, E.M., Worley, P., Malinow, R., Cline, H.T, 2003 "The Immediate-Early Gene Arc Regulates AMPA-Receptor Trafficking", Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA, Abstract No.55.7.
- Richards, D. A., Bliss, T. V., & Richards, C. D., 2003, "Differential modulation of NMDA-induced calcium transients by arachidonic acid and nitric oxide in cultured hippocampal neurons", *Eur.J.Neurosci.*, 17, 2323-2328.
- Roozendaal, B., Koolhaas, J. M., & Bohus, B., 1991, "Attenuated cardiovascular, neuroendocrine, and behavioral responses after a single footshock in central amygdaloid lesioned male rats", *Physiol Behav.*, 50, 771-775.
- Roozendaal, B. & McGaugh, J. L., 1996, "Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 65, 1-8.
- Rouiller, E. M. & Welker, E., 1991, "Morphology of corticothalamic terminals arising from the auditory cortex of the rat: a Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study", *Hearing Research*, 56, 179-190.
- Rüttiger, L., Ciuffani, J., Zenner, H. P., & Knipper, M., 2003, "A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus", *Hearing Research*, 180, 39-50.
- Ryan, A., 1976, "Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatis*", *J.Acoust.Soc.Am.*, 59, 1222-1226.
- Ryu, H., Yamamoto, S., Sugiyama, K., & Uemura, K., 1997, "Selective cochlear neurotomy in the cerebellopontine cistern using electrophysiological monitoring in a patient with intractable tinnitus. Case report", *J.Neurosurg.*, 86, 1053-1056.
- Sachs, L., 2002, "Angewandte Statistik", *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg*
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T., 1988, "Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level", *Science*, 240, 1328-1331.

- Sah, P., Faber, E. S., Lopez, D. A., & Power, J., 2003, "The amygdaloid complex: anatomy and physiology", *Physiol Rev.*, 83 803-834.
- Saint Marie, R. L., Luo, L., & Ryan, A. F., 1999, "Effects of stimulus frequency and intensity on c-fos mRNA expression in the adult rat auditory brainstem", *J.Comp Neurol.*, 404, 258-270.
- Santella, L. & Carafoli, E., 1997, "Calcium signaling in the cell nucleus", *FASEB J.*, 11, 1091-1109.
- Scheel, H., 2003, "Auswirkung chronischer Salicylatapplikation auf das auditorische System der mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)", Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Scheich, H., Heil, P., & Langner, G., 1993, "Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Tonotopic 2-deoxyglucose", *Eur.J.Neurosci.*, 5, 898-914.
- Schreiner, C. E. & Langner, G., 1997, "Laminar fine structure of frequency organization in auditory midbrain", *Nature*, 388, 383-386.
- Scott, S. K., Young, A. W., Calder, A. J., Hellawell, D. J., Aggleton, J. P., & Johnson, M., 1997, "Impaired auditory recognition of fear and anger following bilateral amygdala lesions", *Nature*, 385, 254-257.
- Sharp, F. R., Hisanaga, K., & Sagar, S. M., 1993, "NMDA receptor blockade prevents translation, but not transcription, of the c-fos gene following stimulation with multiple extracellular signals in cultured cortical neurons: implications for plasticity and molecular memory", *NIDA Res.Monogr.*, 125, 172-180.
- Sheng, M. & Greenberg, M. E., 1990, "The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system", *Neuron*, 4, 477-485.
- Shulz, D. E., Cohen, S., Haidarliu, S., & Ahissar, E., 1997, "Differential effects of acetylcholine on neuronal activity and interactions in the auditory cortex of the guinea-pig", *Eur.J.Neurosci.*, 9, 396-409.
- Silva, A. J. 2003, "Molecular and cellular cognitive studies of the role of synaptic plasticity in memory", *J.Neurobiol.*, 54, 224-237.
- Somogyi, P., Tamas, G., Lujan, R., & Buhl, E. H. 1998, "Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex", *Brain Res.Brain Res.Rev.*, 26, 113-135.
- Staiger, J. F., Masannek, C., Bisler, S., Schleicher, A., Zuschratter, W., & Zilles, K. 2002, "Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment", *Neuroscience*, 109, 687-699.
- Steriade, M., 1998, "Corticothalamic networks, oscillations, and plasticity", *Advances in Neurology*, 77, 105-134.
- Steward, O., Falk, P. M., & Torre, E. R., 1996, "Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes", *J.Neurocytol.*, 25, 717-734.

- Steward, O. & Worley, P. F. 2001a, "Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation", *Neuron*, 30, 227-240.
- Steward, O. & Worley, P. F., 2001b, "A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 98, 7062-7068.
- Steward, O. & Worley, P., 2002, "Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation?", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 78, 508-527.
- Stork, O. & Welzl, H., 1999, "Memory formation and the regulation of gene expression", *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 55, pp. 575-592.
- Sugimoto, S., Sakurada, M., Horikawa, J., & Taniguchi, I., 1997, "The columnar and layer-specific response properties of neurons in the primary auditory cortex of Mongolian gerbils", *Hearing Research*, 112, 175-185.
- Sukov, W. & Barth, D. S., 2001, "Cellular mechanisms of thalamically evoked gamma oscillations in auditory cortex", *Journal of Neurophysiology*, 85, 1235-1245.
- Syka, J., 2002, "Plastic changes in the central auditory system after hearing loss, restoration of function, and during learning", *Physiol Rev.*, 82, 601-636.
- Thomas, H., Tillein, J., Heil, P., & Scheich, H., 1993, "Functional organization of auditory cortex in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Electrophysiological mapping of frequency representation and distinction of fields", *Eur.J.Neurosci.*, 5, 882-897.
- Tischmeyer, W. & Grimm, R., 1999, "Activation of immediate early genes and memory formation", *Cell Mol.Life Sci.*, 55, 564-574.
- Tonndorf, J., 1980, "Acute cochlear disorders: the combination of hearing loss, recruitment, poor speech discrimination, and tinnitus", *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 89, 353-358.
- Touma, J. B., 1992, "Controversies in noise-induced hearing loss (NIHL)", *Ann.Occup.Hyg.*, 36, 199-209.
- Tow, P. M. & Whitty, C. W., 1953, "Personality changes after operations on the cingulate gyrus in man", *Journal of Neurochemistry*, 16, 186-193.
- Turrigiano, G. G., 2000, "AMPA receptors unbound: membrane cycling and synaptic plasticity", *Neuron*, 26, 5-8.
- Vallano, M. L., 1998, "Developmental aspects of NMDA receptor function", *Crit Rev.Neurobiol.*, 12, 177-204.
- Vane, J. R., 1971, "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs", *Nat.New Biol.*, 231, 232-235.
- Vane, J. R. & Botting, R. M., 1998, "Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action", *Inflamm.Res.*, 47, 78-87.

- Vazdarjanova, A., Ramirez-Amaya, V., Sutherland, V.L., Chawla, M.K., Worley, P.F., Barnes, C.A., Guzowski, J.F., 2003, "Behavior induces expression of the plasticity-related immediate-early gene Arc in excitatory hippocampal neurons, but not in Astrocytes or inhibitory neurons, *Society for Neuroscience, 33rd Annual Meeting, New Orleans, LA*, Abstract No. 519.7
- Vogt, B. A., Finch, D. M., & Olson, C. R., 1992, "Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions", *Cerebral Cortex*, 2, 435-443.
- Wallhäusser-Franke, E., Braun, S., & Langner, G., 1996, "Salicylate alters 2-DG uptake in the auditory system: a model for tinnitus?", *NeuroReport*, 7, 1585-1588.
- Wallhäusser-Franke, E., 1997, "Salicylate evokes c-fos expression in the brain stem: implications for tinnitus", *NeuroReport*, 8, 725-728.
- Wallhäusser-Franke, E., Mahlke, C., Oliva, R., Braun, S., Wenz, G., & Langner, G., 2003, "Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus", *Exp.Brain Res.*, 153, 649-654.
- Wallhäusser-Franke, E. & Langner, G., 2001, Phantom sounds: mechanisms of tinnitus in the central nervous system. *NeuroReport* 1/01, 21-27.
- Waltereit, R., Dammermann, B., Wulff, P., Scafidi, J., Staubli, U., Kauselmann, G., Bundman, M., & Kuhl, D., 2001, "Arg3.1/Arc mRNA induction by Ca²⁺ and cAMP requires protein kinase A and mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase activation", *Journal of Neuroscience*, 21, 5484-5493.
- Wazen, J. J., Foyt, D., & Sisti, M., 1997, "Selective cochlear neurectomy for debilitating tinnitus", *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology*, 106, 568-570.
- Weedman, D. L. & Ryugo, D. K., 1996, "Pyramidal cells in primary auditory cortex project to cochlear nucleus in rat", *Brain Research*, 706, 97-102.
- Weinberger, N. M. & Bakin, J. S., 1998, "Research on auditory cortex plasticity", *Science*, 280, 1174.
- Weinberger, N. M., 2003, "The nucleus basalis and memory codes: auditory cortical plasticity and the induction of specific, associative behavioral memory", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 80, 268-284.
- Weller, B., 1998, „C-fos Expression im Zentralnervensystem des Gerbils (*Meriones unguiculatus*) in Abhängigkeit von der Salicylatdosis, ein Tiermodell zur Tinnitusentstehung“. Diplomarbeit, TU Darmstadt
- Wenk, G. L., 1997, "The nucleus basalis magnocellularis cholinergic system: one hundred years of progress", *Neurobiol.Learn.Mem.*, 67, 85-95.
- Woodson, W., Farb, C. R., & LeDoux, J. E., 2000, "Afferents from the auditory thalamus synapse on inhibitory interneurons in the lateral nucleus of the amygdala", *Synapse*, 38, 124-137.

- Worley, P. F., Cole, A. J., Murphy, T. H., Christy, B. A., Nakabeppu, Y., & Baraban, J. M., 1990, "Synaptic regulation of immediate-early genes in brain", *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 55, 213-223.
- Wu, J. L., Chiu, T. W., & Poon, P. W., 2003, "Differential changes in Fos-immunoreactivity at the auditory brainstem after chronic injections of salicylate in rats", *Hearing Research*, 176, 80-93.
- Xiao, Z. & Suga, N. 2002, "Reorganization of the cochleotopic map in the bat's auditory system by inhibition", *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 99, 15743-15748.
- Zenner, H. P. & Ernst, A., 1993, "Cochlear-motor, transduction and signal-transfer tinnitus: models for three types of cochlear tinnitus", *Eur.Arch.Otorhinolaryngol.*, 249, 447-454.
- Zhang, J. S. & Kaltenbach, J. A., 1998, "Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus of the rat following exposure to high-intensity sound", *Neuroscience Letters*, 250, 197-200.
- Zhang, J. S., Kaltenbach, J. A., Wang, J., & Kim, S. A., 2003, "Fos-like immunoreactivity in auditory and nonauditory brain structures of hamsters previously exposed to intense sound", *Exp.Brain Res.*
- Zhang, P. C., Keleshian, A. M., & Sachs, F., 2001, "Voltage-induced membrane movement", *Nature*, 413, 428-432.
- Zheng, J., Shen, W., He, D. Z., Long, K. B., Madison, L. D., & Dallos, P., 2000, "Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells", *Nature*, 405, 149-155.
- Ziegelgänsberger, W., 2003, „Extinction of aversive memory – a role for endocannabinoids?“, *Proceedings of the 29th Göttingen Neurobiology Conference*, 116
- Zilles, K. & Wree, A., 1995, „The Rat Nervous System“, Academic Press, 649-685.
- Zuschratter, W., Gass, P., Herdegen, T., & Scheich, H., 1995, "Comparison of frequency-specific c-Fos expression and fluoro-2- deoxyglucose uptake in auditory cortex of gerbils (*Meriones unguiculatus*)", *Eur.J.Neurosci.*, 7, 1614-1626.

AAF	anteriores auditorisches Feld
AC	auditorischer Cortex
AI	primäres auditorisches Feld
AMPA	<i>amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazolepropionic acid</i>
AP1	Aktivatorprotein 1
Arc	<i>activity regulated cytoskeleton-associated protein</i>
Ar	Argon
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AVCN	anterior ventraler CN
BL	basale laterale Amygdala
RSA	Rinderserumalbumin
CaMK	calmodulinabhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CeA	zentrale Amygdala
CeL	laterale Untereinheit der zentralen Amygdala
CN	Nucleus cochlearis
CG	Gyrus cinguli
CPu	Putamen caudatum
CPM	<i>counts per minute</i>
CREB	<i>cAMP-response-element-binding</i>
CRE	<i>cAMP-response-element</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscop</i>
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
DAB	Diaminobenzidin
dB	Dezibel
DCIC	dorsaler Cortex des IC
DCN	dorsaler CN
dEn	dorsaler entorhinaler Cortex
DEPC	Diethylpyrocarbonat
2-DG	2-Deoxyglucose-Methode
DNA	Desoxyribonuleinsäure
dMBG	dorsaler MGB
DP	dorsales posteriores Feld
DPOAE	<i>distortion product otoacoustic emission</i>
DTT	Dithiotreithol
ECIC	externer Cortex des IC
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENS	Eselnormalserum
EtOH	Ethanol
GABA	γ -Aminobuttersäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HeNe	Helium-Neon
HP	Hippocampus
HPA	<i>hypothalamus-pituitary adrenocortical</i>
HRL	Hippocampus-Referenzlinie
IC	Colliculus inferior
ICC	zentraler Kern des IC
IEG	<i>immediate-early gene</i>
IN	interkalierender Nucleus der Amygdala
KCL	Kaliumchlorid
kHz	Kilohertz

KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KPBS	Kaliumphosphatpuffer
LA	laterale Amygdala
LTM	<i>long-term memory</i>
LTP	<i>long-term potentiation</i>
M	Molar
MeA	mediale Amygdala
MePD	posterior-dorsaler Teil der MeA
mMBG	medialer MGB
MGB	Corpus geniculatum mediale
mPFC	medialer PFC
mRNA	<i>messengerRNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NBW	schmallbandiges weißes Rauschen (<i>narrow band white noise</i>)
NMDA	N-methyl-D-aspartat
NLL	Nucleus lemniscus lateralis
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PC	Parietalcortex
PFC	präfrontaler Cortex
PKA	Proteinkinase A
PRh	perirhinaler Cortex
PSD	Postsynapse (<i>postsynaptic density</i>)
PVCN	posterior ventraler CN
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	Salzpuffer aus Natriumchlorid und Natriumcitrat
SI	Substantia innominata
SO	Oliva superior
SPL	<i>sound pressure level</i>
T	Triton
TFc	konstitutioneller Transkriptionsfaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
UTP	Uracil-5'-triphosphat
vMBG	ventraler MGB
VP	ventrales posteriores Feld
VCN	ventraler CN

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name : Claudia Christiane Mahlke
geboren am: 12.02.68
in : Berlin

Schulbildung

1974-1978 Grundschule in Aachen und Markgröningen
1978-1984 Hans-Grüniger Gymnasium, Markgröningen
 Abschluss: Mittlere Reife
1988-1991 Kolleg am Stiftsgymnasium, Sindelfingen
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium

1992-1999 Studium der Biologie an der TU-Darmstadt
 Hauptfächer: Zoologie/ Biochemie
 Nebenfächer: Pharmakologie/ Psychologie
1998-1999 Diplomarbeit im Bereich der Neuroanatomie
 Abschluss: Diplom
2001-2004 Promotion am Institut für Zoologie der TU Darmstadt;
 Förderung über ein Stipendium des Forschungsreferats der
 TU Darmstadt
 Seit Februar 2002 Kollegiatin im Graduiertenkolleg 340
 „Kommunikation in biologischen Systemen“

Berufliche Ausbildung

1984-1987 Ausbildung zur Speditionskauffrau bei der Firma "deutsche
 kleiderspedition" (dks), Aschaffenburg mit Abschlussprüfung
 vor der Industrie- und Handelskammer, Aschaffenburg

Berufliche Tätigkeit

1987 Anstellung bei der Firma Birkart Internationale Spedition,
 Aschaffenburg; gleichzeitig Teilnahme an einem Austausch-
 programm innerhalb der Fa. Birkart mit Beschäftigung bei
 Birkart Southeastasia, Singapore.
1999-2000 Produktmanagerin im GIT VERLAG, Darmstadt, mit der
 Aufgabe der redaktionellen Betreuung und der strategischen
 Entwicklung der Zeitschrift *Umwelt Technologie Aktuell*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe und dass ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Claudia Mahlke

Darmstadt, den 18. März 2004